

Einfluss der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7
auf zelluläre Adhäsionsprozesse an der Gefäßwand *in vivo*

- Untersuchungen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie
an zwei Verletzungsmodellen der Maus -

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Annegret Perk

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. med. vet. A. Moritz

und der
III. Medizinischen Klinik für Kardiologie und Kreislauferkrankungen
(Prof. Dr. med. M. Gawaz, Ärztlicher Direktor)
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Betreuer: Prof. Dr. med. A. May

**Einfluss der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7
auf zelluläre Adhäsionsprozesse an der Gefäßwand *in vivo*
- Untersuchungen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie
an zwei Verletzungsmodellen der Maus -**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Annegret Perk,
Tierärztin aus Villingen-Schwenningen

Gießen, 2012

Mit Genehmigung der Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. med. vet. Andreas Moritz

Prof. Dr. med. Andreas May

Tag der Disputation:

09. Januar 2012

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM.....	2
2.1	Aufbau und Funktion der Blutgefäße	2
2.1.1	Wandaufbau von Arterien, Venen und Kapillaren	2
2.1.2	Funktion des Gefäßendothels.....	4
2.2	Verletzung des Gefäßendothels.....	6
2.3	Ischämie und Reperfusion	7
2.3.1	Mechanismen während der Ischämie	7
2.3.2	Reperfusionsschaden	8
2.4	Monozyten.....	9
2.4.1	Herkunft und Morphologie der Monozyten	9
2.4.2	Die Interaktion von Monozyten mit der Gefäßwand	10
2.4.3	Die Funktion der Monozyten	12
2.4.3.1	Die allgemeine Funktion der Monozyten	12
2.4.3.2	Die Rolle der Monozyten in der Atherogenese.....	12
2.4.4	Die Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren für Monozyten	14
2.5	Thrombozyten.....	15
2.5.1	Herkunft und Morphologie der Thrombozyten	15
2.5.2	Die Interaktion von Thrombozyten mit der Gefäßwand	17
2.5.3	Die Funktion der Thrombozyten	20
2.5.3.1	Die Rolle der Thrombozyten für die Hämostase	20
2.5.3.2	Die Rolle der Thrombozyten für die Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms.....	22
2.5.4	Die Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren für Thrombozyten....	23
2.6	Progenitorzellen.....	23
2.6.1	Herkunft und Morphologie der Progenitorzellen	23
2.6.2	Die Interaktion von Progenitorzellen mit der Gefäßwand	25
2.6.3	Die Funktion von Progenitorzellen	26
2.6.3.1	Die allgemeine Funktion von Progenitorzellen	26
2.6.3.2	Die Rolle von Progenitorzellen für die vaskuläre und myokardiale Regeneration	28
2.6.4	Die Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren für Progenitorzellen.....	28
2.7	Chemokine	29
2.7.1	Die Struktur und Nomenklatur von Chemokinen	29
2.7.2	Die Funktion von Chemokinen	32
2.7.3	Die Chemokine CXCL12/SDF-1 und CXCL11/I-TAC	32
2.7.3.1	SDF-1/CXCL12.....	32
2.7.3.1.1	Die Bezeichnung und Struktur von SDF-1/CXCL12.....	32
2.7.3.1.2	Die Expression und Funktion von SDF-1/CXCL12	34
2.7.3.2	I-TAC/CXCL11	35
2.7.3.2.1	Die Bezeichnung und Struktur von I-TAC/CXCL11.....	35
2.7.3.2.2	Die Expression und Funktion von I-TAC/CXCL11	36
2.8	Chemokinrezeptoren.....	36
2.8.1	Die Struktur und Nomenklatur von Chemokinrezeptoren	36
2.8.2	Die Funktion und Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren	37
2.8.3	Die Chemokinrezeptoren CXCR7 und CXCR4.....	38
2.8.3.1	Struktur und Liganden der Rezeptoren CXCR7 und CXCR4	38
2.8.3.2	Die Entdeckung des CXCR7- und CXCR4- Rezeptors	39
2.8.3.3	Die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR7 und CXCR4.....	40
2.8.3.4	Die Funktion der CXCR7/SDF-1- und der CXCR4/SDF-1 -Achse	41
2.8.3.5	Die Signaltransduktionswege der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7	46

3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	49
3.1	Zielsetzung	49
3.2	Untersuchungsgut und Methoden.....	50
3.2.1	Übersicht über den Ablauf der Versuche	50
3.2.2	Isolierung, Färbung und Vorinkubation der verwendeten Zellen	52
3.2.2.1	Isolierung von humanen Monozyten	52
3.2.2.2	Isolierung von humanen Thrombozyten	53
3.2.2.3	Isolierung von humanen CD34 ⁺ Zellen.....	53
3.2.2.4	DCF-Färbung von humanen Monozyten	54
3.2.2.5	DCF-Färbung von humanen Thrombozyten.....	54
3.2.2.6	DCF-Färbung von humanen CD34 ⁺ Zellen	55
3.2.2.7	Vorinkubation der verwendeten Zellen mit blockierenden Antikörpern	55
3.2.3	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	56
3.2.4	Aufbau des Arbeitsplatzes.....	57
3.2.5	Wahl, Durchführung und Überwachung der Narkose.....	58
3.2.6	Vorbereitung der Versuchstiere für die Intravitalmikroskopie	58
3.2.6.1	Vorbereitung für die Aufnahmen an der Arteria carotis	59
3.2.6.2	Vorbereitung für die Aufnahmen am Dünndarm.....	60
3.2.7	Methode und Durchführung der Intravitalmikroskopie	61
3.2.7.1	Intravitalmikroskopie an der Arteria carotis communis	62
3.2.7.2	Intravitalmikroskopie am Dünndarm.....	63
3.2.8	Dokumentation und Auswertung der IVM-Aufnahmen	64
3.2.9	Statistische Berechnungen.....	65
3.3	Ergebnisse	65
3.3.1	Allgemeine Darstellung der Versuche	65
3.3.2	Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Monozyten.....	68
3.3.2.1	Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Monozyten im ligaturinduzierten Verletzungsmodell der Arteria carotis communis	68
3.3.2.1.1	Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle.....	68
3.3.2.1.2	Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle.....	70
3.3.2.2	Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Monozyten im Ischämie-Reperfusionsmodell des Dünndarms	73
3.3.2.2.1	Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle in den Venolen.....	73
3.3.2.2.2	Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen.....	75
3.3.2.2.3	Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle in den Venolen.....	78
3.3.2.2.4	Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen.....	81
3.3.3	Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Thrombozyten	84
3.3.3.1	Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Thrombozyten im ligaturinduzierten Verletzungsmodell der Arteria carotis communis	84
3.3.3.1.1	Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle	84
3.3.3.1.2	Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle	86
3.3.3.2	Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Thrombozyten im Ischämie-Reperfusionsmodell des Dünndarms	89
3.3.3.2.1	Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle in den Venolen	89
3.3.3.2.2	Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen.....	91
3.3.3.2.3	Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle in den Venolen	94
3.3.3.2.4	Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen	96
3.3.4	Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen CD34 ⁺ Stammzellen.....	99
3.3.4.1	Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen CD34 ⁺ Zellen im ligaturinduzierten Verletzungsmodell der Arteria carotis communis	99
3.3.4.1.1	Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten CD34 ⁺ Zellen mit der Isotypkontrolle.....	99
3.3.4.1.2	Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten CD34 ⁺ Zellen mit der Isotypkontrolle.....	102
3.3.4.1.3	Vergleich von anti-CXCR4 und anti-CXCR7 vorbehandelten CD34 ⁺ mit den Isotypkontrollen	104
3.3.4.2	Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen hämatopoetischen CD34 ⁺ Stammzellen im Ischämie-Reperfusionsmodell des Dünndarms.....	107
3.3.4.2.1	Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten CD34 ⁺ Zellen mit der Isotypkontrolle in den Venolen.....	107
3.3.4.2.2	Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten CD34 ⁺ Zellen mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen	109
3.3.4.2.3	Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten CD34 ⁺ Zellen mit der Isotypkontrolle in den Venolen.....	112
3.3.4.2.4	Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten CD34 ⁺ Zellen mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen.....	114

4	DISKUSSION	117
4.1	Diskussion der Versuchsdurchführung.....	117
4.1.1	Das Mausmodell.....	117
4.1.2	Die Methode der Intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (IVM).....	117
4.1.2.1	Darstellung von Zellinteraktionen mit der Gefäßwand mittels IVM.....	117
4.1.2.2	Mögliche Komplikationen und Schwierigkeiten bei der IVM.....	119
4.1.3	Verwendung der Antikörper anti-CXCR4 und anti-CXCR7	120
4.1.3.1	Gründe für die Wahl von anti-CXCR4 und anti-CXCR7 in vivo.....	120
4.1.3.2	Schwierigkeiten bei der Verwendung von anti-CXCR4 und anti-CXCR7.....	121
4.1.4	Gründe für den Einsatz von humanen Monozyten, Thrombozyten und CD34 ⁺ hämatopoetischen Stammzellen	122
4.1.4.1	Der Einsatz von humanen Monozyten.....	122
4.1.4.2	Der Einsatz von humanen Thrombozyten	123
4.1.4.3	Der Einsatz von humanen CD34 ⁺ hämatopoetischen Progenitorzellen	125
4.2	Diskussion der Ergebnisse	128
4.2.1	Bemerkungen zum Versuchsablauf bei beiden Verletzungsmodellen.....	128
4.2.2	Ergebnisse aus dem Carotismodell	129
4.2.2.1	Verminderte Adhäsion von Monozyten durch Blockade des CXCR7-Rezeptors verglichen mit einer CXCR4-Rezeptor-Blockade	129
4.2.2.2	Signifikant reduzierte Adhäsion von Thrombozyten im Carotismodell durch Blockade des CXCR7-Rezeptors	129
4.2.2.3	Signifikant reduzierte Adhäsion von CD34 ⁺ Zellen im Carotismodell durch Blockade des CXCR4- sowie des CXCR7-Rezeptors	130
4.2.3	Ergebnisse aus dem Darmmodell.....	130
4.2.3.1	Geringere Interaktion von Monozyten mit der Gefäßwand der Venolen unter Einsatz von anti- CXCR7 als unter Einsatz von anti-CXCR4	130
4.2.3.2	Signifikant reduzierte Adhäsion adhärenter Thrombozyten in den Venolen unter Einsatz eines blockierenden Antikörpers gegen CXCR7	131
4.2.3.3	Reduzierte Adhäsion von CD34 ⁺ Zellen in den Venolen unter Einsatz eines blockierenden Antikörpers gegen CXCR4 sowie gegen CXCR7	131
4.2.4	Vergleich beider Mausmodelle bezüglich Art und Dauer der Verletzung sowie Verteilung und Adhäsionsverhalten der verwendeten Zellen	132
4.2.5	Der Einfluss von CXCR4 und CXCR7 auf die Adhäsion humaner Monozyten im Vergleich zu anderen Adhäsionsrezeptoren.....	134
4.2.6	Der Einfluss von CXCR4 und CXCR7 auf die Adhäsion humaner Thrombozyten im Vergleich zu anderen Adhäsionsrezeptoren	135
4.2.7	Der Einfluss von CXCR4 und CXCR7 auf die Adhäsion humaner hämato- poetischer CD34 ⁺ Stammzellen im Vergleich zu anderen Adhäsionsrezeptoren	136
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	137
5	ZUSAMMENFASSUNG	139
6	SUMMARY.....	141
7	LITERATURVERZEICHNIS	143
8	TABELLENVERZEICHNIS	181
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	182

10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	187
11	DANKSAGUNG	191

1 EINLEITUNG

Nach Angaben des deutschen statistischen Bundesamts sind im Jahre 2009 knapp 42% der Todesfälle in Deutschland auf Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zurückzuführen. Eine der häufigsten Todesursachen stellt darunter der akute Myokardinfarkt mit 7% der Sterbefälle dar.

Dem akuten Myokardinfarkt und der instabilen Angina pectoris geht als gemeinsame pathophysiologische Ursache eine Ruptur atherosklerotischer Plaques mit nachfolgender arterieller Okklusion voraus (GAWAZ 1999; STRAUER 2001). Zur Beseitigung des Gefäßverschlusses kommen gängige Therapieansätze mittels Ballondilatation oder Stentimplantation sowie die medikamentöse Thrombolyse zum Einsatz (STRAUER 2001). Allerdings treten im Zuge dieser Eingriffe häufig zusätzliche Schädigungen des Gefäßendothels mit erhöhtem Risiko einer Restenose auf.

Im Interesse der Forschung steht die Entwicklung neuer Therapieformen, welche zum einen den Prozess der Re-Endothelialisierung beschleunigen sollen. Eine verstärkte Rekrutierung von Stammzellen an Gefäßdefekte, die nachfolgend zur Endothelialisierung beitragen, kann dabei hilfreich sein. Zum anderen wird nach neuen Möglichkeiten gesucht, am geschädigten Gefäßendothel thrombogenen und inflammatorischen Vorgängen entgegen zu wirken. Dabei spielt die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten wie Monozyten an die verletzte Gefäßwand eine herausragende Rolle.

Diese Arbeit gliedert sich in ein Gesamtprojekt ein, in dessen Rahmen die differenzielle Rolle der Rezeptoren CXCR7 und CXCR4 bezüglich der Adhäsion humaner Monozyten, Thrombozyten und CD34⁺ Stammzellen *in vitro* und *in vivo* herausgearbeitet wird.

Die vorliegende Arbeit soll an zwei Verletzungsmodellen der Maus Aufschluss über die Interaktion von humanen Monozyten, Thrombozyten und CD34⁺ Zellen mit der Gefäßwand geben. Im Speziellen lautet die Fragestellung, inwiefern durch eine Blockade des CXCR7-Rezeptors (im Vergleich zu einer Blockade des CXCR4-Rezeptors) auf humanen Monozyten, Thrombozyten und CD34⁺ Zellen, die Adhäsion genannter Zellen an Gefäßwanddefekte beeinflusst werden kann.

Diese Zell-Endothel-Interaktionen werden mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie optisch dargestellt und ausgewertet.

2 **SCHRIFTTUM**

2.1 **Aufbau und Funktion der Blutgefäße**

2.1.1 **Wandaufbau von Arterien, Venen und Kapillaren**

Das Kreislaufsystem besteht aus dem Herzen und den Blutgefäßen. Die Blutgefäße setzen sich im Einzelnen aus Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen zusammen.

Neben der ständigen Aufrechterhaltung der Blutzirkulation, hat der Blutkreislauf die Aufgabe des Gas- und Nährstoffaustauschs sowie der Regulation des Thermohaushalts und des Transports von Stoffen wie Hormonen, Ionen und Enzymen.

Arterien verzweigen sich mehrfach und gehen dabei unter kontinuierlicher Abnahme des Gefäßdurchmessers in kleinere Arterien über, die schließlich in ihre kleinsten Einheiten, die Arteriolen, münden. Arteriolen wiederum münden nach weiterer Verzweigung in eng vernetzte Kapillaren. Dort findet der Gas- und Nährstoffaustausch mit dem Gewebe statt. Die postkapillären Gefäßabschnitte sammeln sich in den Venolen. Diese gehen unter stetiger Größenzunahme in kleine, mittelgroße und große Venen über (LIEBICH 2004a).

Den kreislaufdynamischen Anforderungen entsprechend, ist der Wandaufbau größerer Gefäße unterschiedlich angepasst (Hoch-Niederdrucksystem).

Dem Aufbau von Arterien und Venen liegt stets ein ähnlicher Grundbauplan zugrunde, der mit drei ineinander gesteckten Röhrchen vergleichbar ist (*Abb. 1*).

Der innersten Wandschicht, der *Intima (Tunica interna)* liegt die *Media (Tunica media)* an, gefolgt von der äußeren Wandauskleidung, der *Adventitia (Tunica externa)*.

Die *Intima* besteht aus einem einschichtigen Endothel (*Lamina endothelialis*) mit unterlagerter Basalmembran, einem bindegewebigen *Stratum subendotheliale* und der *Membrana elastica interna*. Die *Media* setzt sich hauptsächlich aus mehreren Lagen glatter Muskulatur zusammen, in die elastische und kollagene Fasern eingelagert sind. Den Übergang zur *Adventitia* bildet die *Membrana elastica externa*. Die *Adventitia* stellt durch ein Netzwerk aus fibroelastischen Fasern des Kollagen Typs I die lockere Verschiebeschicht zum angrenzenden Gewebe dar.

Die Gefäßwände werden durch sympathische Nervenfasern innerviert.

Die Ernährung der Gefäßwand erfolgt in der Adventitia und äußeren Schichten der Media über Vasa vasorum, während die Intima und innere Bereiche der Media durch Diffusion aus dem zirkulierenden Blut versorgt werden.

Dem arteriellen Druck und den damit verbundenen Aufgaben angepasst, variiert bei den Arterien der Grundbauplan der Gefäßwand, sodass sich zwei Typen von Arterien unterscheiden lassen, Arterien vom elastischen und vom muskulären Typ. Zu den *Arterien vom elastischen Typ* gehören herznahe Gefäße wie Aorta und A. pulmonaris. Die Kollagenfasern des stark verbreiterten Stratum subendotheliale nehmen zum elastischen Gewebe der Media Verbindung auf. Hauptcharakteristisch ist das elastisch-muskuläre System, welches durch den Kontakt elastischer Faserbündel der Media mit einzelnen glatten Muskelzellen entsteht. Zudem sorgen eingelagerte Elastinlamellen für die zusätzliche Dehnungsfähigkeit dieses Arterientyps. Die Aufgabe elastischer Arterien besteht darin, die in Herznähe pulsatorisch ausgestoßene Blutmenge in eine kontinuierliche Strömung umzuwandeln, was auch als Windkesselfunktion bezeichnet wird. Die *Arterien vom muskulären Typ* repräsentieren den größten Teil der im Körper vorkommenden mittelgroßen und kleineren Arterien. Sie zeigen als Hauptcharakteristikum einen hohen Gehalt an zirkulär oder spiralig laufenden glatten Muskelzellen in der Media. Die ausgeprägte Muskelschicht dient neben der Aufrechterhaltung des intravasalen Drucks dazu, die Pulswelle im arteriellen Hochdrucksystem zu regulieren. (SCHUMMER und HABERMEHL 1996; ENGELHARDT 2000; LIEBICH 2004a).

Die venösen Gefäße ähneln in ihrem Aufbau den Arterien. Sie weisen ebenfalls einen dreischichtigen Wandaufbau auf, allerdings ist die Schichtung weniger stark ausgeprägt. So besteht das Stratum subendotheliale der Intima lediglich aus einer schwachen Bindegewebsschicht aus lockeren kollagen-elastischen Fasern und an Stelle der Membrana elastica interna ist ein dünnes Netz elastischer Fasern vorhanden. Die im Gegensatz zu Arterien dünnwandigere Tunica media besteht vorwiegend aus kollagenen und elastischen Fasern und schließt einen geringen Anteil an schraubenförmig angeordneten glatten Muskelzellen ein. Dadurch entsteht eine räumliche Anordnung fibro-muskulärer Elemente, die der Venenwand ihre außerordentliche Fähigkeit zur flexiblen Dehnung ermöglicht. Diese Dehnungsfähigkeit ist das herausragende Merkmal der Venenwände, neben der Besonderheit, in kleinen und mittelgroßen Venen Venenklappen auszubilden, die eine Umkehr der

Strömungsrichtung verhindern und den Rückfluss des Blutes zum Herzen erleichtern (SCHUMMER und HABERMEHL 1996; ENGELHARDT 2000; LIEBICH 2004a).

Die Innenwand der Kapillaren besteht lediglich aus einem einschichtigen Endothel. Dem Endothel außen anliegend folgt eine vollständige oder unterbrochene Basalmembran. Außerdem sind die meisten Kapillaren außen von Perizyten umgeben, welche teilweise noch von einer weiteren Basalmembran umhüllt werden.

In Abhängigkeit von der funktionellen Stoffwechselleistung der Gewebe werden drei Kapillartypen unterschieden: Geschlossene Kapillaren (Kapillaren mit zusammenhängendem Endothel), Fenestrierte Kapillaren (Kapillaren mit fenestriertem Endothel) und Sinusoide Kapillaren (offene Kapillaren mit diskontinuierlichen Endothel) (LIEBICH 2004a).

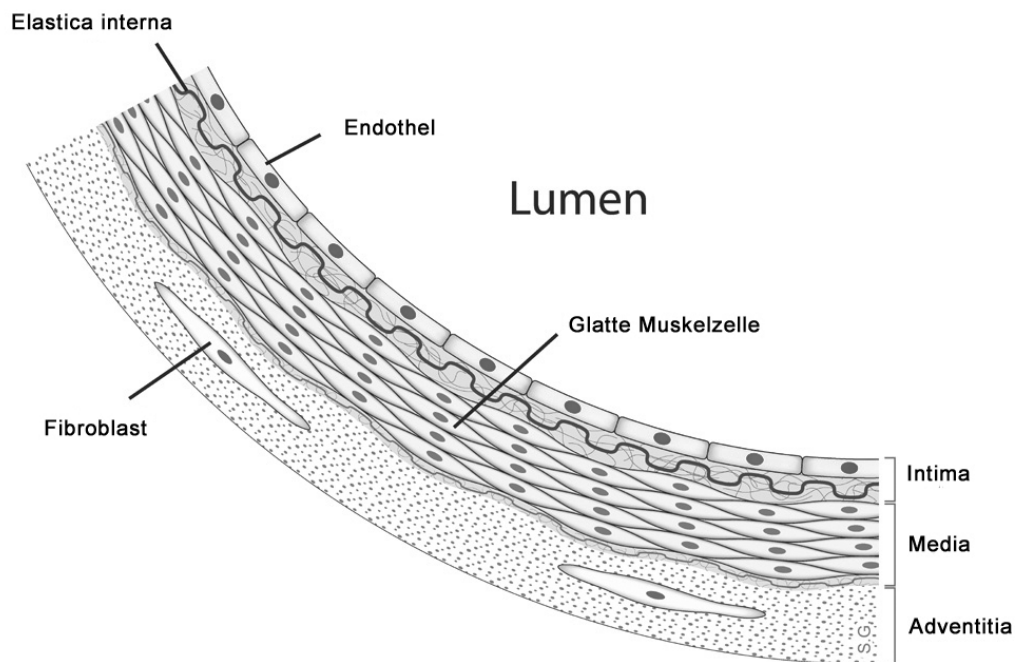


Abb. 1: Aufbau einer Gefäßwand (modifiziert nach: *Anatomy overview of a human artery made for PhD project. Maastricht, november 2005. Stijn A.I. Ghesquiere* www.applesnail.net; http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/05/Anatomy_artery.png; <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/deed.de>).

2.1.2 Funktion des Gefäßendothels

Das einschichtige Endothel der Gefäßwand stellt ein äußerst komplexes "Organ" dar, welches in ständiger Kommunikation mit seiner Umgebung steht. Es trennt zirkulierende Blutbestandteile von thrombogenen Strukturen des Subendothels beziehungsweise vom umliegenden Gewebe (VANE et al. 1990).

Neben der Auskleidung der Gefäßwand gehören zu den Aufgaben des Endothels die Regulation des Gefäßtonus, der Lipid- und Amin-Metabolismus, die Angiogenese, die Beteiligung an immunologischen und inflammatorischen Prozessen sowie die Kontrolle von Zellbewegungen ins Gewebe durch Steuerung der Adhäsion und Transmigration von Leukozyten. Das Endothel übernimmt außerdem organspezifische Funktionen. Dazu gehören beispielsweise der Gasaustausch in der Lunge, die Regulation der Herzkontraktion und die Phagozytose von Blutzellen in Leber und Milz.

Zu einer der wichtigsten Aufgaben des Endothels zählt jedoch die Regulation von Thrombusformation und Fibrinolyse (DZAU et al. 1993; GIBBONS und DZAU 1994, CELERMAJER 1997).

Im physiologischen, antithrombotischen Zustand, verhindert das Endothel die Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten, wirkt einer überschießenden Thrombusformation entgegen und fördert die Vasodilatation.

Gerät die hämostatische Balance jedoch im Zuge metabolischer, physikalischer oder inflammatorischer Reize aus dem Gleichgewicht, so nimmt das Endothel einen prothrombotischen Charakter an. Das Einsetzen der Hämostase und die Bildung von Thromben und Fibrinablagerungen werden begünstigt. Außerdem kommt es zu einer vermehrten Leukozytenaktivierung und zur verstärkten Vasokonstriktion. Überdies wird die Proliferation glatter Muskelzellen in Bereichen der Media gefördert (DZAU et al. 1993; CELERMAJER 1997; BECKER et al 2000).

Als endokrines Organ sezerniert das Endothel beziehungsweise Zellen der Gefäßwand (wie beispielsweise glatte Muskelzellen) eine Reihe von vasoaktiven Substanzen, pro- und antithrombotischen, Wachstums-, sowie pro- und antiinflammatorischen Faktoren (DZAU et al 1993; GAWAZ 1999).

Vasodilatoren wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI_2) regulieren den Gefäßtonus über die Relaxation glatter Muskelzellen in der Gefäßwand. NO und Prostazyklin modulieren darüber hinaus die Hämostase durch Inhibierung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation (VANE et al. 1990; LIAO 1998).

Aktivierte Thrombozyten setzen dagegen vasokonstriktorisches Substanzen frei. Dazu zählen beispielsweise die Adeninnukleotide Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin und Thromboxan A_2 . Genannte Vasokonstriktoren führen in Endothelzellen zu einer Stimulation der Synthese des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP), wodurch

es wiederum zu einer vermehrten Bildung von NO kommt. Dies hat einen Feedbackmechanismus zur Folge, der wiederum mit Dilatation der Gefäße und Hemmung der Thrombozytenaktivierung einhergeht (VANE et al. 1990; LIAO 1998; GAWAZ 1999).

2.2 Verletzung des Gefäßendothels

Eine Verletzung des Gefäßendothels hat die Freilegung extrazellulärer Matrixproteine zur Folge. Zu diesen subendothelialen Strukturen gehören Proteoglykane, Kollagen, Fibronectin, Laminin und vWF (von Willebrand Faktor) (MASSBERG et al. 2003a; MASSBERG et al. 2003b).

Beim ligaturinduzierten Verletzungsmodell der Arteria carotis communis der Maus, wie es in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kommt, wird eine mechanische Endothelverletzung durch eine fünf Minuten andauernde Ligatur der Carotiden erzielt. Der Verlust der Endothelzellbarriere zwischen Strukturen der extrazellulären Matrix und dem Blut induziert den Prozess der Hämostase (RUGGERI 2002) (siehe auch Kapitel 2.5.3.1).

Aktiviertes Endothel exprimiert P-Selektin, welches mit dem Glykoprotein PSGL-1 (P-selectin glykoprotein ligand-1) auf Thrombozyten interagiert und ein Rollen ("rolling") der Thrombozyten bewirkt (GAWAZ et al. 2005b). Eine initiale Adhäsion ("platelet tethering") der Thrombozyten wird über die Bindung von Thrombozyten an vWF (über den Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplex) und an Kollagen (über GPVI) vermittelt (siehe Kapitel 2.5.2). Die feste Adhäsion erfolgt über β_3 -Integrine (siehe Kapitel 2.5.2).

Auf die Adhäsion folgt die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten (GAWAZ 1999). Aktivierte Thrombozyten sezernieren eine Vielzahl an proinflammatorischen Mediatoren. Diese induzieren nicht nur die Expression von verschiedenen endothelialen Adhäsionsrezeptoren wie beispielsweise VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule-1) und P-Selektin, sondern auch die Freisetzung von endothelialen Chemokinen (GAWAZ 2004). Auf diese Art und Weise werden weitere Blutzellen angelockt, die an die Gefäßwand binden. So führt eine endotheliale Dysfunktion zur Einwanderung von Leukozyten wie beispielsweise Monozyten (TONNESEN 1989; MEHRABIAN et al. 1991). Andere, gleichfalls von aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten sezernierte Mediatoren, wie zum Beispiel SDF-1 (stromal cell derived factor-1), beteiligen sich an der Rekrutierung von Stammzellen (MASSBERG et al. 2006).

2.3 Ischämie und Reperfusion

2.3.1 Mechanismen während der Ischämie

Der Begriff Ischämie ist definiert als eine verminderte oder unterbrochene Durchblutung eines Organs, Organteils oder Gewebes infolge mangelnder arterieller Blutzufuhr, zum Beispiel durch Thrombose oder Embolie (PSCHYREMBEL 2004). Dabei ist zwischen der relativen Ischämie (unzureichende Blutzufuhr) und der absoluten Ischämie (fehlende Blutzufuhr) zu unterscheiden. Das Anfangsstadium einer Ischämie wird als anoxische Phase bezeichnet, in der der Blutfluss reduziert ist. Es folgt die postischämische Phase im Spätstadium der Ischämie nach erneuter Blutzufuhr (FREI 1990).

In der Ischämie besteht ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoff- beziehungsweise Substratangebot und -bedarf. Hält die Unterversorgung des betroffenen Gewebes zu lange an, kommt es zu Apoptose und Nekrose (REIMER und JENNINGS 1992; HEARSE et al. 1993).

Funktionelle und strukturelle Veränderungen der Zellen kommen dadurch zustande, dass weder genügend Sauerstoff, noch Nährstoffe zur Verfügung stehen und Endprodukte des Zellstoffwechsels nicht mehr abtransportiert werden. Aufgrund der bestehenden Hypoxie, wird der Stoffwechsel von aerober auf anaerobe Glykolyse umgestellt mit Folgen einer Zellazidose, die durch eine Anhäufung von Laktat, sowie Protonen und anorganischem Phosphat gekennzeichnet ist (JENNINGS et al. 1981; REIMER und JENNINGS 1992; HEARSE et al. 1993). Zelluläre Ionenpumpen sind nicht mehr in der Lage, die Homöostase der Elektrolyte zu steuern, sodass sich ein gestörtes Membranpotential entwickelt. Durch eine Ansammlung intrazellulärer Kalziumionen werden endogene Phospholipasen aktiviert, welche die Plasmamembran schädigen. Es bildet sich ein Membranödem aus, des Weiteren kommt es zur Zellschwellung (NAYLER und ELZ 1986; FORMAN et al. 1990).

Wichtige Energiereserven der Zelle wie die Phosphatverbindungen ATP, ADP und Kreatinphosphat sind innerhalb weniger Minuten verbraucht.

Außerdem besteht durch den Verlust von Enzymen wie der Superoxiddismutase, der Gluthationperoxidase und der Katalase sowie Antioxidantien wie Vitamin E, Ascorbinsäure und Cystein, kein wirksamer Schutz mehr gegen freie Radikale, was zur Pathogenese des Reperfusionsschadens beiträgt (FERRARI et al. 1985).

2.3.2 Reperfusionsschaden

Beim Vorgang der Reperfusion werden zuvor minder durchblutete, ischämische Organ- oder Gewebsbezirke wieder mit sauerstoffhaltigem Blut versorgt. Jedoch kommt es im Bereich reperfundierter Areale zu einer zusätzlichen Schädigung der Zellen, woraus sich der Begriff Reperfusionsschaden ableitet (NAYLER und ELZ 1986).

Für den Reperfusionsschaden sind hauptsächlich zwei pathophysiologische Ursachen verantwortlich. Einerseits eine starke Belastung der Zellen durch freie Sauerstoffradikale, andererseits ein vermehrter Einstrom von Kalziumionen in die Zelle. Jedoch bleibt schwer zu unterscheiden, ob der Zelltod tatsächlich infolge der Reperfusion eintritt, oder ob lediglich eine Kompensation der durch die Ischämie zu weit vorangeschrittenen Zellschäden nicht mehr möglich ist (MAXWELL und LIP 1997).

Beim Ischämie-Reperfusionsmodell am Darm der Maus, wie es in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kommt, wird ein Ischämie-Reperfusionsschaden durch eine einstündige Ligatur des versorgenden Mesenterialgefäßes sowie beider Enden des ausgewählten Darmsegments induziert. Durch die postischämische Reperfusion unterliegt das Endothel einer funktionellen Störung und geht in einen prothrombotischen Zustand über (BECKER et al. 2000). Genauer gesagt entwickelt das aktivierte Endothel adhäsionsvermittelnde Eigenschaften (SIEGEL-AXEL et al. 2006), was mit einer vermehrten Expression von Rezeptoren wie beispielsweise P-Selektin und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) einhergeht (BECKER et al. 2000). Der endotheliale P-Selektin-Rezeptor interagiert mit PSGL-1 (P-selectin glykoprotein ligand 1) auf Thrombozyten, während P-Selektin auf Plättchen an PSGL-1 auf Leukozyten bindet (LEFER et al. 1998; MASSBERG et al. 1998b; KOGAKI et al. 1999).

Die Schädigung der Darmmucosa führt außerdem zu einer erhöhten Permeabilität, was vermehrt neutrophile Granulozyten einwandern lässt. Histologisch ist neben der Ablösung der Mucosa eine Ulzeration der Villi erkennbar (CHEN et al. 2004).

Beim Reperfusionsvorgang können zelluläre Komponenten wie neutrophile Granulozyten durch eine Verlegung des Kapillarlumens zu einer weiteren Schädigung des Endothels in der Mikrozirkulation führen (FORMAN et al. 1990). Dadurch unterliegen Gewebsbezirke mit potentiell überlebensfähigen Zellen einer stetig verminderten Durchblutung. Dieser Effekt wird auch als "no-reflow" - Phänomen beschrieben (KLONER et al. 1974).

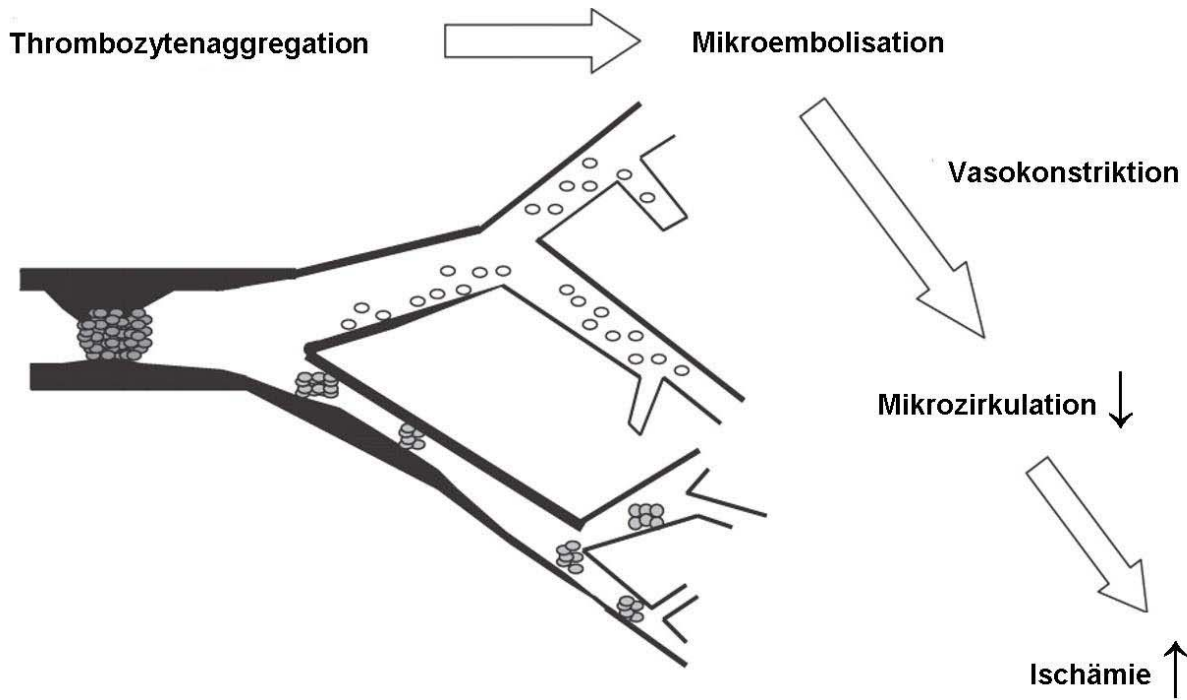


Abb. 2: Bildung eines thrombotischen Gefäßverschlusses (modifiziert nach Gawaz 2004)

2.4 Monozyten

2.4.1 Herkunft und Morphologie der Monozyten

Monozyten gehören zusammen mit den Granulozyten und Lymphozyten in die Gruppe der Leukozyten. Sie entwickeln sich wie alle Blutzellen aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Mit einer Größe von 12-20 μm sind reife Monozyten die größten der im Blut zirkulierenden weißen Blutzellen. Morphologisch kennzeichnen sich diese mononukleären Zellen durch einen runden bis nierenförmig eingezogenen Kern und ein schmales, schwach basophiles Zytoplasma. Als Ausdruck ihrer phagozytotischen Aktivität befinden sich auf der Zelloberfläche Pseudopodien und im Zytoplasma eine dichte Ansammlung von Granula (Lysosomen), die proteolytische Enzyme enthalten (LIEBICH 2004b).

Bei einer Lebensdauer von 60-90 Tagen sind Monozyten langlebige Zellen, die sich zu Gewebsmakrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren können (LIEBICH 2004b; LUSTER et al. 2005).

2.4.2 Die Interaktion von Monozyten mit der Gefäßwand

Die Rekrutierung von zirkulierenden Monozyten an Endotheldefekte ist ein mehrstufiger Prozess (LANGER und CHAVAKIS 2009), der mit der Hochregulation einer Reihe von Zelladhäsionsmolekülen auf Monozyten einhergeht (*Abb.3*).

Als initialer Schritt wird die Bindung des Sialomucins PSGL-1 auf Monozyten an das zelluläre Adhäsionsmolekül P-Selektin (CD62P) angesehen, das von aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert wird. Die Bindung zwischen PSGL-1 und P-Selektin vermittelt den Vorgang der losen, transient adhärenen Adhäsion („tethering“) und des Rollens („rolling“) der Monozyten an der Gefäßwand (ELSTAD et al. 1995; WEYRICH et al. 1995).

Die feste Adhäsion der Monozyten wird wiederum durch Integrine vermittelt. Integrine sind glykosylierte heterodimere Proteine aus nicht kovalent assoziierten α - und β - Untereinheiten auf der Oberfläche nahezu aller Zellarten, die Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix verbinden. Sie vermitteln das Rollen und die stabile Adhäsion von Zellen an extrazelluläre Matrixproteine oder von Zellen untereinander (GONZALEZ-AMARO und SÁCHEZ-MADRID 1999; HYNES 2002). Die α -Untereinheit determiniert die Spezifität, während die β - Untereinheit der strukturellen Unterscheidung dient (GAWAZ 1999; HYNES 2002; NEWMAN 2006). Als Antwort auf deren Aktivierung durchlaufen Integrine eine Reihe konformationeller Änderungen, die eine erhöhte Bindungsaffinität zu ihren Liganden zur Folge haben (LUO et al. 2007). Integrine sind an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen von Geweben, an der Tumorphiliferation und -metastasierung sowie an der Adhäsion und Migration von Leukozyten beteiligt.

Im Zusammenhang mit der Atherosklerose gilt VLA-4 (very late antigen-4), auch unter der Bezeichnung $\alpha_4\beta_1$ -Integrin bekannt, als wichtigstes Integrin auf Monozyten (MAY et al. 2000; HUO und LEY 2001). Dessen Ligand ist VCAM-1 auf Endothelzellen, welches zur Immunglobulin-Superfamilie der Adhäsionsmoleküle gehört. VLA-4 kommt in zwei verschiedenen Konformationen vor. Im niedrig affinen Zustand vermittelt es über VCAM-1 den Prozess des Rollens (ALON et al. 1995), während im hoch affinen Zustand die feste Adhäsion begünstigt wird. *Ex vivo* Untersuchungen der Carotiden von ApoE-defizienten Mäusen unter fettreicher Diät zeigen, dass die Rollgeschwindigkeit von perfundierten Monozyten erhöht und deren Adhäsion durch eine Blockade von VCAM-1 beziehungsweise VLA-4 deutlich reduziert ist (RAMOS et al. 1999; HUO et al. 2000).

Ein weiterer Rezeptor, der als Adhäsionsmolekül auf Monozyten fungiert, ist LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1). Es gehört in die Gruppe der leukozytären β_2 -Integrine und bindet an das auf Endothelzellen exprimierte ICAM-1 (MARLIN und SPRINGER 1987). Die Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 führt zur Stabilisierung der Adhäsion (LUSCINSKAS et al. 1994).

Monozyten können mit aktivierten Thrombozyten eine transiente Bindung über P-Selektin/PSGL-1 (LARSEN et al. 1989; MOORE et al. 1992; WAGNER und FRENETTE 2008) und eine feste Bindung über Mac-1 (macrophage-1 antigen; CD11b/CD18; $\alpha_M\beta_2$) eingehen (SIMON et al. 2000; EHLERS et al. 2003). Als entsprechende Gegenrezeptoren für dieses Integrin sind auf Thrombozyten bislang beispielsweise GPIb α (Glykoprotein Ib α) (SIMON et al. 2000; EHLERS et al. 2003), JAM-C (junctional adhesion molecule-C; JAM3) (SANTOSO et al. 2002; LANGER et al. 2007) und ICAM-2 (DIACOVO et al. 1994) sowie das an GPIIb/IIIa (Glykoprotein IIb/IIIa; $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin) auf Plättchen gebundene Fibrinogen beschrieben (WEBER und SPRINGER 1997).

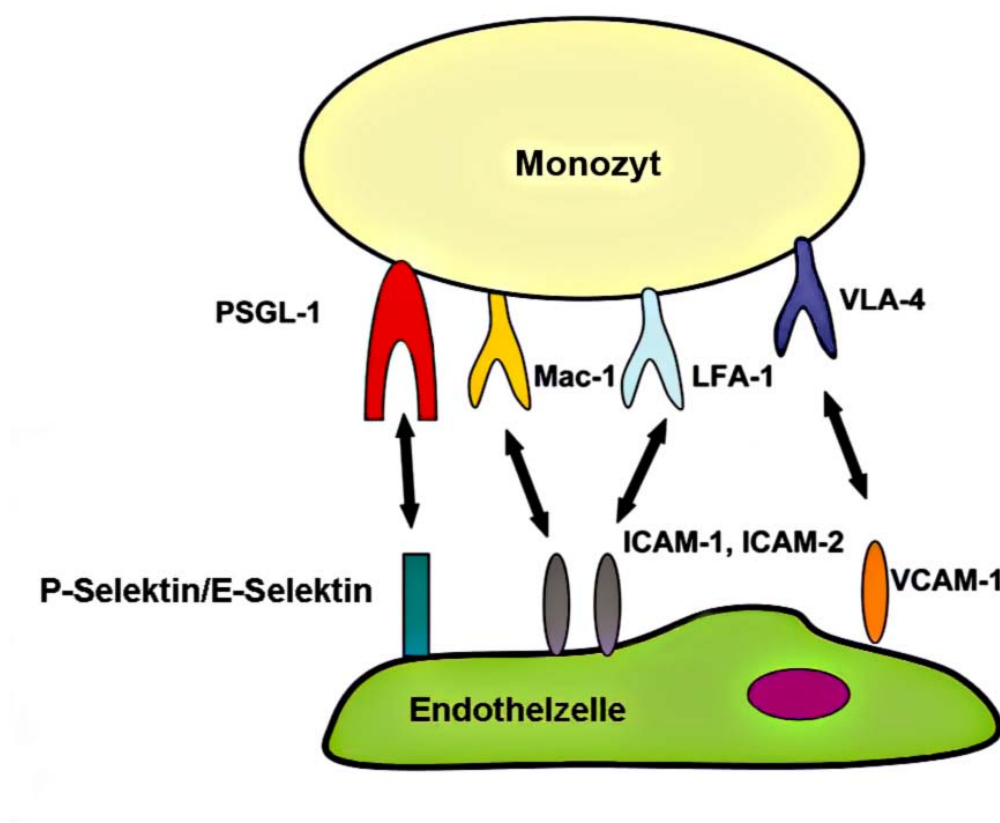


Abb. 3: Die Interaktion zwischen Monozyt und Endothel (modifiziert nach Langer und Chavakis 2009).

2.4.3 Die Funktion der Monozyten

2.4.3.1 Die allgemeine Funktion der Monozyten

Charakteristischerweise zirkulieren Monozyten für circa zwei Tage im Blut, bevor sie dann aktiv die Blutbahn verlassen und in das interstitielle Bindegewebe auswandern. Dort findet unter dem Einfluss lokaler Faktoren eine Differenzierung zu Makrophagen statt, welche die Fähigkeit zur Phagozytose von Zellresten und mikrobiellen Erregern besitzen. Daher sind Monozyten Bestandteil des mononukleären Phagozytensystems und übernehmen eine Vielzahl organspezifischer Funktionen. So beispielsweise als Histiozyten im lockeren Bindegewebe oder als Alveolarmakrophagen in der Lunge. Außerdem sind Monozyten durch ihre Fähigkeit Antigene präsentieren zu können, an der spezifischen Immunabwehr beteiligt und wirken zudem durch die Sekretion von Komplementfaktoren und Zytokinen chemotaktisch auf andere Blutzellen (GÖBEL und KASPERS 2000; LIEBICH 2004b).

Monozyten können mit zahlreichen entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Atherosklerose in Verbindung gebracht werden (LUSTER et al. 2005).

2.4.3.2 Die Rolle der Monozyten in der Atherogenese

Die Atherosklerose wird als "eine variable Kombination von Veränderungen der Arterienintima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia" (ROESSNER 2004) definiert. Der Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung liegen im Wesentlichen die Entstehung und die Progression atherosklerotischer Plaques zugrunde (MURRAY und LOPEZ 1997a; MURRAY und LOPEZ 1997b). Zu atherosklerotischen Risikofaktoren, welche die Atherogenese begünstigen, gehören beispielsweise Hyperlipidämie, Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Adipositas, Hyperurikämie, hormonelle und Stress induzierte Faktoren sowie eine familiäre Disposition (FUSTER et al. 1998; LUSIS 2000; ROESSNER et al. 2001).

Die Entstehung atherosklerotischer Plaques ist ein mehrstufiger Prozess (Stadium I-III), an dessen Pathogenese Monozyten eine maßgebliche Rolle spielen (*Abb. 4*). Anfangs liegt stets eine endotheliale Dysfunktion vor (Stadium I) mit der Folge einer erhöhten Permeabilität des Endothels für cholesterinreiche Lipoproteine und deren Ablagerung in der Intima (ROSS

1999). Der entscheidende Auslösemechanismus der Intimaveränderung ist pathophysiologisch gesehen jedoch die Monozytenchemotaxis, deren nachfolgende Adhäsion an die Gefäßwand, deren Transmigration, die Umwandlung in Makrophagen und die Phagozytose von lipidreichem Material, genannt oxidiertes LDL (low density lipoprotein), wodurch sich Monozyten in Schaumzellen ("foam cells") differenzieren. In der Intima abgelagerte Schaumzellen bilden sogenannte "fatty streaks" (GAWAZ 1999; ROESSNER et al. 2001). Die Vermehrung der Schaumzellen lässt die Plaque wachsen und das Endothel weiter schädigen, wodurch die Adhäsion von Thrombozyten begünstigt wird, welche PDGF (platelet derived growth factor) sezernieren. PDGF fördert zusammen mit weiteren Wachstumsfaktoren, die von Endothelzellen und Makrophagen gebildet werden, die Proliferation glatter Muskelzellen (ROESSNER et al. 2001), was eine Verdickung der Intima (Atherombildung) zur Folge hat (GAWAZ 1999). Eine Fibrosierung der Plaque entsteht, wenn glatte Muskelzellen die Synthese von Kollagenen, Proteoglykanen und elastischen Fibrillen einleiten. Im weiteren Verlauf gehen Schaumzellen zugrunde und bilden einen nekrotischen Kern (Stadium II) aus Zelldetritus, Lipiden und Cholesterinkristallen (LUSIS 2000). Die Plaque ist stabil solange sie von einer fibrösen Kappe bedeckt ist und das thrombogene Material vom Blutstrom getrennt wird (FALK 1991; LIBBY 1998). Das dritte Stadium der Atherosklerose ist dann erreicht, wenn die fibröse Kappe ihre Stabilität verliert, vulnerabel wird und die Wahrscheinlichkeit einer Ruptur steigt (ROSS 1999; LUSIS 2000). Die pathophysiologischen Folgen einer Plaqueruptur werden in Kapitel 2.5.3.2 beschrieben.

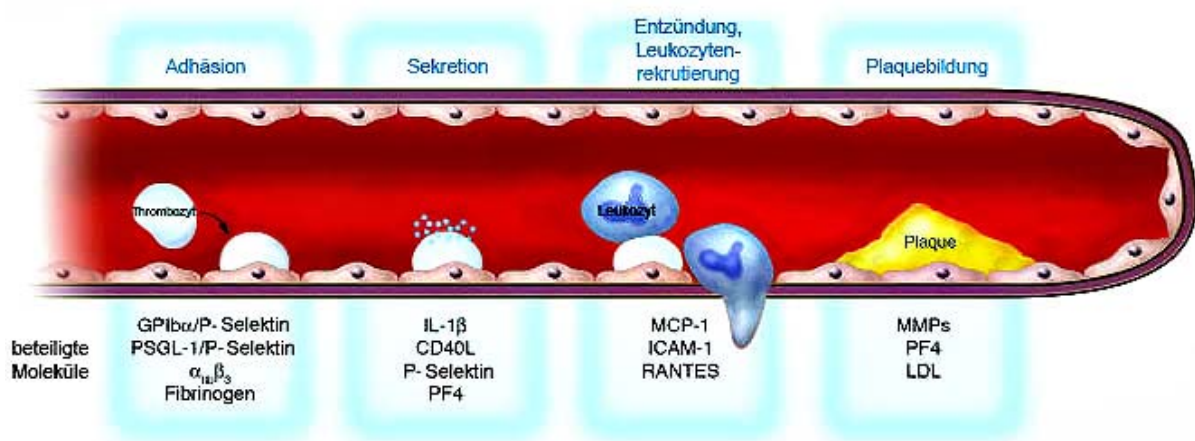


Abb. 4: Modell der Atherogenese (modifiziert nach Gawaz et al. 2005b).

2.4.4 Die Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren für Monozyten

Aktivierte Endothelzellen exprimieren eine Vielzahl von Chemokinen, die zur Rekrutierung von Monozyten an die Gefäßwand beitragen. Chemokine können an Glykosaminoglykane auf Endothelzellen binden. Rollende Monozyten gehen wiederum über passende Chemokinrezeptoren eine Bindung mit diesen immobilisierten Chemokinen ein. Dies führt zur vollständigen Aktivierung von leukozytären Integrinen, welche die feste Adhäsion der Monozyten an die Gefäßwand vermitteln. Daher sind Chemokine in der Lage rollende Monozyten zu arretieren (TANAKA et al. 1993; CAMPBELL et al. 1998; WEBER et al. 1999).

Für Mitglieder der CXC-Chemokin-Familie, wie CXCL1, -2 und -3 (HUO et al. 2001, SMITH et al. 2005), CXCL4 (PF4, Platelet factor 4) (VON HUNDELSHAUSEN et al. 2005) und CXCL8 (IL-8, Interleukin-8) (GERSZTEN et al. 1999) und Chemokine der CCL Familie, wie CCL2 (MCP-1, monocyte chemotactic protein-1) (GAWAZ et al. 1998) und CCL5 (RANTES) (HUO et al. 2003; VON HUNDELSHAUSEN et al. 2005) ist bekannt, dass sie das "Abstoppen" rollender Monozyten auf aktiviertem Endothel vermitteln. Vor allem die beiden Chemokine CXCL4 und CCL5 in Kombination erhöhen zusammen mit ihren Rezeptoren die Adhäsion von Monozyten an aktivierte Endothelzellen (VON HUNDELSHAUSEN et al. 2005).

CXCL1 beispielsweise vermittelt die Rekrutierung und Adhäsion über den G-Protein gekoppelten CXCR2-Rezeptor auf Monozyten (SMITH et al. 2005). CCL5, als Ligand der Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 (GEAR und CAMERINI 2003), induziert die Adhäsion und Transmigration von Monozyten über Integrine und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 (VON HUNDELSHAUSEN et al. 2001). Auch über das Chemokin CX₃CL1 und dessen Rezeptor CX₃CR1 kann eine Adhäsion von Monozyten an aktiviertes Endothel erfolgen (IMAI et al. 1997). Zudem kann dieses Chemokin-Rezeptorpaar die Expression von ICAM-1 induzieren und somit die Adhäsion von Monozyten fördern (YANG et al. 2007).

CXCL4, das unter anderem von aktivierten Thrombozyten exprimiert wird, weist neben seiner chemotaktischen Wirkung (DEUEL et al. 1981) die Eigenschaft auf, die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen beziehungsweise Schaumzellen zu fördern (SCHEUERER et al. 2000; CHO et al. 2007), was im Kontext der Atherosklerose eine wichtige pathogenetische Rolle spielt.

Sowohl für CXCL4, CXCL1 als auch für CCL2, CCL5 und CX₃CL1 wurde mit Hilfe von Atherosklerosemodellen in Mäusen gezeigt, dass durch den Knockout des jeweiligen

Chemokins beziehungsweise dessen Rezeptor eine deutliche Reduktion atherosklerotischer Läsionen erzielt werden kann (KUZIEL et al. 1997; BORING et al. 1998; DAWSON et al. 1999; GOSLING et al. 1999; COMBADIERE et al. 2003; LESNIK et al. 2003; BOISVERT et al. 2006; SACHAIS et al. 2007; QUINONES et al. 2007; SAEDERUP et al. 2008).

Inwiefern die auf Monozyten vorhandenen Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 über die Bindung des Chemokins SDF-1 (CXCL12) an der Adhäsion humaner Monozyten an Endothelzellen *in vivo* beteiligt sind, ist bislang ungeklärt.

2.5 Thrombozyten

2.5.1 Herkunft und Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten (Blutplättchen) entwickeln sich aus Stammzellen im Knochenmark, die sich unter mehrfacher Vermehrung des Chromosomensatzes ohne nachfolgende Kernteilung zu Megakaryozyten differenzieren. Durch die Abschnürung und Fragmentierung von Zytoplasmaanteilen der Megakaryozyten entstehen membranbegrenzte, kernlose Zerfallsprodukte, welche die reifen Thrombozyten darstellen. Mit einem Durchmesser von nur 2-4 µm stellen Blutplättchen die kleinsten korpuskulären Bestandteile des zirkulierenden Blutes dar. Nach einer Lebensdauer von sieben bis zehn Tagen erfolgt der Abbau der Thrombozyten im retikuloendothelialen System der Leber und der Milz (GAWAZ 1999; GEORGE 2000; LIEBICH 2004c). Ruhende und aktivierte Thrombozyten unterscheiden sich morphologisch (*Abb. 5*). Im nicht aktivierten Zustand weisen Thrombozyten eine diskoidale Form auf, während aktivierte Blutplättchen durch Ausstülpungen der Plasmamembran eine Formveränderung durchlaufen und damit ihre Oberfläche vergrößern. Diese Ausstülpungen werden als Pseudopodien bezeichnet (GAWAZ 1999).

Betrachtet man die Ultrastruktur eines Thrombozyten genauer, so kann diese in vier morphologische Zonen unterteilt werden (GAWAZ 1999):

1. periphere Zone
2. Strukturelle Zone
3. Zone der Organellen
4. Zone der Membransysteme

Die **periphere Zone** besteht aus der Zytoplasmamembran (aus polarisierten Phospholipiden) und der darauf liegenden Glykokalyx, die sich aus Proteinen, Glykoproteinen und Mukopolysacchariden zusammensetzt. Integrierte Proteine der Plasmamembran dienen als Rezeptoren für lösliche Agonisten (zum Beispiel ADP) oder für Adhäsionsproteine (zum Beispiel von-Willebrand-Faktor).

Die **strukturelle Zone** besteht aus submembranös gelegenen Mikrotubuli und einem Netzwerk aus anderen Strukturproteinen, welche die typische diskoide Form der Thrombozyten im ruhenden Zustand erhalten, sich aber auch an der Formveränderung aktivierter Thrombozyten beteiligen. Das Zytoskelett wird vorwiegend aus Strukturproteinen wie Aktin und Aktin-Bindungsprotein gebildet. Bei der Aktivierung werden Filamente aus Aktin und Myosin gebildet.

Die im Zytoplasma lokalisierte **Zone der Organellen** besteht aus Mitochondrien, Glykogenspeichern und aus drei unterschiedlichen Arten von Speichergranula, den Dichte-Granula, den α -Granula und den Lysosomen. Die Granula sind für Plättchen hauptcharakteristisch und ihr Inhalt für die Thrombozytenfunktion unabdinglich (GAWAZ 2004). Die elektronenoptisch betrachteten Dichte-Granula enthalten Stoffe wie ADP, ATP, Ca^{2+} und Serotonin, die gemeinsam den Vorgang der Thrombozytenaggregation fördern. α -Granula beinhalten neben Wachstums- und Koagulationsfaktoren auch Enzyme sowie adhäsive und zytokinähnliche Proteine. Lysosomale Granula bevorraten hydrolytische Enzyme wie Elastase und Kollagenase.

Die vierte morphologische Zone, das **Membransystem**, setzt sich aus einem offenen kanalikulären und einem dichten tubulären System zusammen. Das offene kanalikuläre System reicht mit seinen gewundenen Kanälen bis ins Thrombozyteninnere und steht nach außen über Poren in der Plasmamembran mit dem Extrazellularraum in Kontakt. Das dichte tubuläre System stellt den Hauptspeicherort für freie Kalziumionen dar, welche die Hauptrolle bei der Regulation des Thrombozytenmetabolismus und der Thrombozytenaktivierung spielen. Sobald der Schwellenwert der freien zytoplasmatischen Kalziumkonzentration überschritten wird, kommt es zur Formveränderung durch Pseudopodienbildung und Degranulation (GAWAZ 1999; GEORGE 2000).

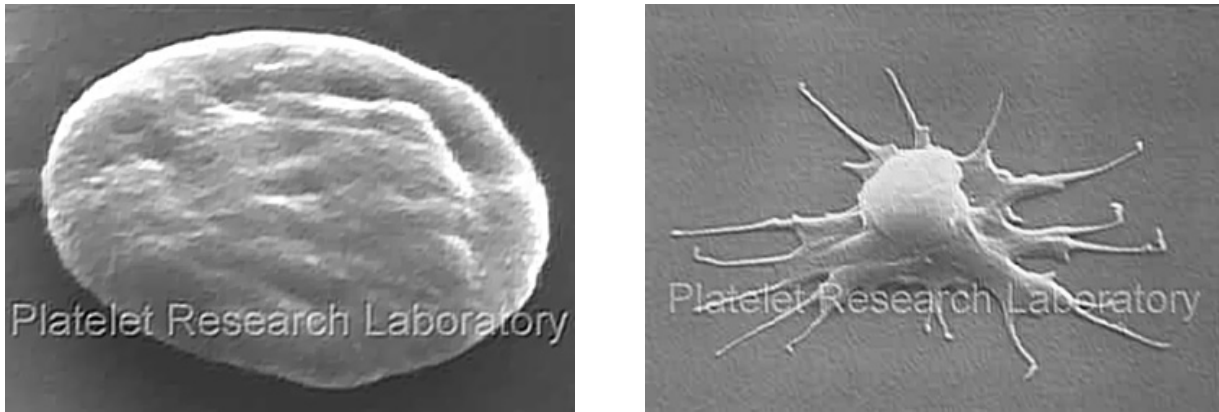


Abb. 5: ruhender (links) und aktivierter (rechts) Thrombozyt (nach http://www.platelet-research.org/1/function_hemo.htm).

2.5.2 Die Interaktion von Thrombozyten mit der Gefäßwand

Auf Thrombozyten sind membranständige Glykoproteine vorhanden, die als spezifische Adhäsionsrezeptoren fungieren. Im Kontext der Hämostase und Thrombose ermöglichen sie eine Interaktion zwischen Thrombozyten untereinander sowie den Kontakt von Thrombozyten mit dem Endothel (Abb. 6), mit der subendothelialen Matrix, mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren und mit Leukozyten. Anhand der Molekülstruktur können thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren in vier Gruppen eingeteilt werden: *Integrine*, *leuzinreiche Glykoproteine*, *Selektine* und *Rezeptoren vom Immunglobulintyp* (GAWAZ 1999; GAWAZ 2004). Im Folgenden werden diese kurz erläutert:

Integrine (Definition siehe Kapitel 2.4.2) steuern auf Thrombozyten die Thrombozytenaggregation und -adhäsion. Durch Thrombozytenagonisten, wie beispielsweise Thrombin oder ADP, erfahren thrombozytäre Integrine über intrazelluläre Signaltransduktionswege eine Konformationsänderung und werden dadurch aktiviert ("inside-out signaling"). Über die direkte Bindung von Liganden an Integrinrezeptoren wird ebenfalls eine Konformationsänderung mit nachfolgender Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden herbeigeführt ("outside-in-signaling") (PHILLIPS et al. 1988; GAWAZ 1999; MASSBERG et al. 2002; MAY et al. 2002).

Auf Thrombozyten sind bislang fünf verschiedene Integrine beschrieben. Davon gehören drei der β_1 - Klasse an: $\alpha_2\beta_1$ (Kollagenrezeptor), $\alpha_5\beta_1$ (Fibronektinrezeptor), $\alpha_6\beta_1$ (Lamininrezeptor) und zwei der β_3 - Klasse: $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fibrinogenrezeptor), $\alpha_v\beta_3$ (Vitronektinrezeptor). Der am häufigsten auf Thrombozyten und Megakaryozyten vorkommende Adhäsionsrezeptor ist der GPIIb-IIIa Rezeptor (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$), dessen Hauptfunktion darin besteht lösliches Fibrinogen

an aktivierte Thrombozyten zu binden, was den initialen Schritt der primären Thrombozytenaggregation darstellt. Er wird daher auch als Fibrinogenrezeptor bezeichnet. Ruhende Blutplättchen tragen unter physiologischen Bedingungen den nicht aktivierten GPIIb-IIIa Rezeptor, welcher lediglich immobilisiertes Fibrinogen binden kann. Im Zuge einer Aktivierung der Thrombozyten erfährt GPIIb-IIIa eine Konformationsänderung und wird von einem niedrig affinen in einen hoch affinen Funktionszustand überführt, was diesem Rezeptor ermöglicht lösliches Fibrinogen zu binden (PHILLIPS et al. 1988; GAWAZ et al. 1991; GINSBERG 1995; GAWAZ 1999).

Der Lamininrezeptor ($\alpha_6\beta_1$), der Fibronectinrezeptor ($\alpha_5\beta_1$) und der Kollagenrezeptor ($\alpha_2\beta_1$) sind gemeinsam für die primäre Adhäsion von Blutplättchen an die Gefäßwand verantwortlich, wobei vor allem der Kollagenrezeptor maßgeblich an der primären Aktivierung und stabilen Adhäsion von Thrombozyten beteiligt ist (GAWAZ 1999).

Leuzinreiche Glykoproteine, zu denen der Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplex und das Glykoprotein IV gehören, sind reich an der Aminosäure Leuzin (GAWAZ 1999). Glykoprotein IV bindet an Kollagen Typ V, hat jedoch kaum einen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung (MOROI und JUNG 1997; SIXMA et al. 1997). Der Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplex stellt den Adhäsionsrezeptor für den in Kollagenfibrillen immobilisierten vWF dar. Im Kontext der Hämostase vermittelt GPIb-V-IX über vWF den initialen losen Kontakt ("platelet tethering") von Thrombozyten mit der verletzen Gefäßwand im Bereich arterieller Strömungen mit hohen Scherkräften (SAVAGE et al. 1996; GAWAZ 1999; RUGGERI 2003).

Bei **Selektinen** handelt es sich um vaskuläre Adhäsionsrezeptoren, die heterotypische Interaktionen von Zellen vermitteln. Bisher sind drei verschiedene Selektine beschrieben: *P*-, *E*- und *L*-Selektine. *P*-Selektin wird in α -Granula der Thrombozyten und in sogenannten Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert und erst als Antwort auf eine Aktivierung der Zelle auf der Oberfläche exprimiert. Die initiale Kontaktaufnahme ("rolling") zwischen zirkulierenden Thrombozyten und dem Endothel wird zwischen PSGL-1 auf Plättchen und P-Selektin auf Endothelzellen vermittelt. *E*-Selektin, welches sich ebenfalls auf aktivierten Endothelzellen befindet, vermittelt die Adhäsion von Granulozyten. *L*-Selektin, das von aktivierten Leukozyten exprimiert wird, fördert deren Adhäsion an Endothel (McEVER 1994; TEDDER et al. 1995; GAWAZ 1999; GAWAZ 2004).

Zu den **Rezeptoren vom Immunglobulintyp** gehören PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) und ICAM-2 sowie GPVI. GPVI, als wichtigster Vertreter der Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulintyp (CLEMETSON et al. 1999), stellt einen Rezeptor für Kollagen Typ I-III dar und ist bedeutend für die kollageninduzierte Thrombozytenaktivierung- und aggregation (SUGIYAMA et al. 1987, MOROI et al. 1989). Eine erste Bindung von Thrombozyten ("platelet tethering") an geschädigtes Endothel erfordert die Interaktion zwischen GPVI und Kollagen (MASSBERG et al. 2003a; MASSBERG et al. 2003b). Neuere Untersuchungen zeigen, dass außerdem die Interaktion des thrombozytären GPVI mit dem immunglobulinähnlichen Rezeptor Emmprin (Basigin, CD147) das Rollen von Thrombozyten *in vitro* signifikant erhöht (SEIZER et al. 2009).

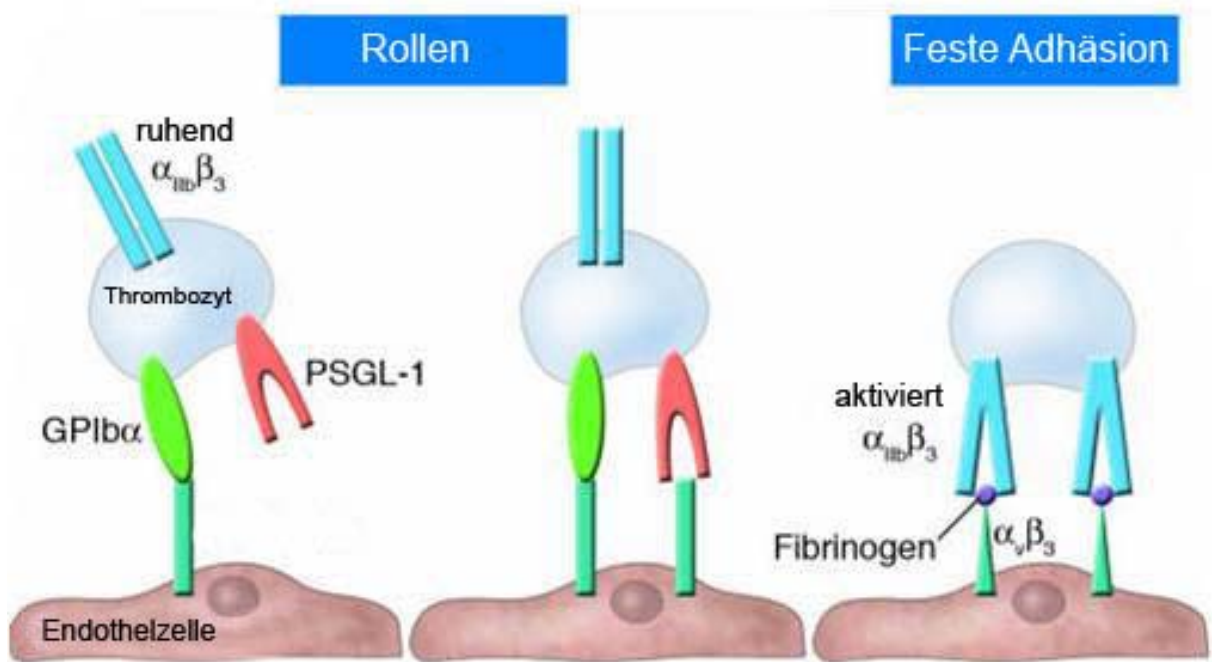


Abb. 6: Interaktion zwischen Thrombozyten und dem Endothel (modifiziert nach Gawaz et al. 2005b).

2.5.3 Die Funktion der Thrombozyten

2.5.3.1 Die Rolle der Thrombozyten für die Hämostase

Wird die Integrität der Gefäßwand infolge traumatischer Einwirkungen aufgehoben und treten Blutungen in das umliegende Gewebe ein, wird durch Thrombozyten der Prozess der Hämostase eingeleitet. Bei der Hämostase findet ein enges Zusammenwirken zwischen Thrombozyten, der Gefäßwand und plasmatischen Gerinnungsfaktoren statt. Nach dem zeitlichen Ablauf erfolgt eine Einteilung der Hämostase in drei Stadien: primäre und sekundäre Hämostase sowie Fibrinolyse (GAWAZ 1999).

Bei der **primären Hämostase** (Blutstillung) kommt es zu einer ersten Abdeckung der Gefäßwandläsion durch Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation mit Bildung eines weißen, plättchenreichen, primären, fragilen Thrombus. Die so genannte *primäre Adhäsion* umfasst die Anlagerung ruhender Plättchen und führt zur deren Formveränderung (Pseudopodienbildung) und Aktivierung (GAWAZ 1999). Freiliegende Strukturen der extrazellulären Matrix (beispielsweise Kollagen, vWF) sind Triggerfaktoren für die Thrombozytenaktivierung (GAWAZ et al. 2005). Die Anlagerung bereits aktivierter Thrombozyten wird als *sekundäre Adhäsion* bezeichnet (GAWAZ 1999). Der Vorgang der losen und stabilen Adhäsion wird durch Glykoproteine auf der Thrombozytenmembran gesteuert (siehe Kapitel 2.5.2.1) (PHILLIPS et al. 1988; GAWAZ et al. 1991; SAVAGE et al. 1996; GAWAZ 1999; MASSBERG et al. 2002; MASSBERG et al. 2003a). Während der Adhäsion sezernieren aktivierte Thrombozyten Granulainhaltsstoffe (proinflammatorische und prokoagulatorische Faktoren), die andere Plättchen zur Aggregation anregen (GAWAZ 1999; MASSBERG et al. 2002). Für die Thrombozytenaggregation sind Scherkräfte sowie Ca^{2+} und Fibrinogen notwendig. Ca^{2+} und Fibrinogen sind sowohl im Plasma als auch in thrombozytären Granula vorhanden (GAWAZ 1999). In der primären Phase der Aggregation werden Ca^{2+} -abhängig Fibrinogenbrücken gebildet, wodurch Thrombozyten untereinander reversibel miteinander verbunden werden (PHILLIPS et al. 1988). Eine zentrale Bedeutung kommt dabei dem GPIIb-IIIa-Komplex zu (siehe Kapitel 2.5.2.1) (GAWAZ 1999; MASSBERG et al. 2002). Eine irreversible Stabilisierung der Fibrinogenbrücken erfolgt erst nach Degranulation aktivierter Plättchen (GAWAZ 1999; STEINHUBL und MOLITERNO 2005).

Bei der **sekundären Hämostase** (Blutgerinnung) kommt es im Zuge der Aktivierung der Gerinnungskaskade zur Bildung eines roten, sekundären, fibrinreichen, festen Thrombus. Die Aktivierung der Gerinnung erfolgt über eine komplexe enzymatische Kaskade. Diese kann auf exogenem Weg (extrinsisches System) durch Gewebeläsion (Freisetzung von "tissue factor") oder auf endogenem Weg (intrinsisches System) durch Kontakt von Thrombozyten mit dem Subendothel eingeleitet werden. Beide Wege enden in der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin durch Thrombin. Fibrin führt zur Quervernetzung der Thrombozyten untereinander und verfestigt das fragile Plättchenaggregat (FALK 1991; GAWAZ 1999).

In der Phase der **Fibrinolyse** erfolgt der hämolytische Abbau des Thrombus und die Heilungsphase der Gefäßwand wird eingeleitet (GAWAZ 1999).

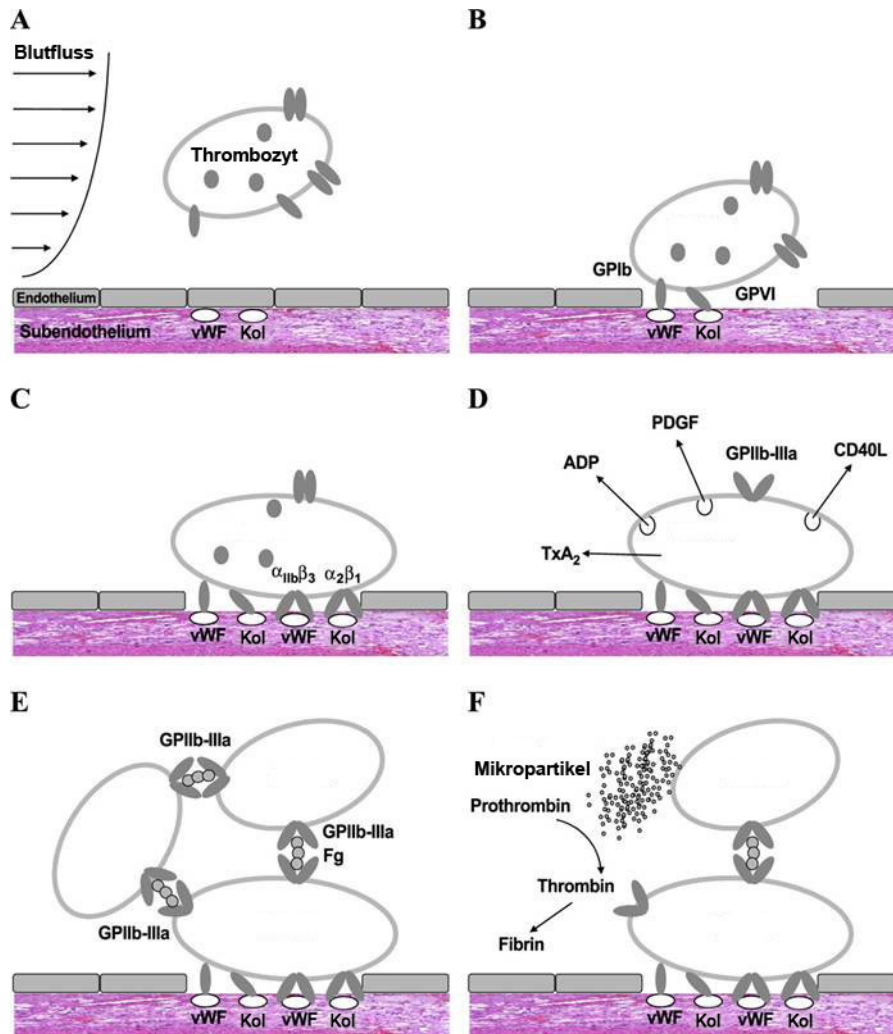


Abb. 7: Thrombozytenadhäsion und -aggregation (modifiziert nach Gawaz 2004).

2.5.3.2 Die Rolle der Thrombozyten für die Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms

Der Begriff des akuten Koronarsyndroms umfasst ein klinisches Spektrum akuter oder rasch fortschreitender Symptome einer myokardialen Ischämie. Bei der stabilen Angina pectoris wird eine verringerte Sauerstoffversorgung des myokardialen Gewebes durch eine stabile atherosklerotische Plaque hervorgerufen, die das Gefäß einengt (GAWAZ 1999). Das akute Koronarsyndrom dagegen ist pathophysiologisch durch eine akute Plaqueruptur bedingt, bei der subendotheliale Matrix freigelegt wird mit nachfolgender Thrombozytenadhäsion, -aggregation und Thrombusbildung (GAWAZ 1999; LIBBY 2002). Die Folgen können ein arterieller Gefäßverschluss und die Ischämie des nachgeschalteten Gewebes sein. Aus diesem Grund nehmen Thrombozyten beim thrombotischen Gefäßverschluss als Komplikation der fortgeschrittenen Atherosklerose eine wichtige Rolle ein (ROSS 1999). Der Schweregrad und die Dauer der Gefäßokklusion sowie das Vorhandensein von Kollateralgefäßen bestimmen, ob sich ein akuter Myokardinfarkt entwickelt (GAWAZ 1999).

Patienten mit instabiler Angina pectoris weisen eine erhöhte Thromboxanbildung auf, was für eine erhöhte Aktivierung zirkulierender Thrombozyten spricht (FITZGERALD et al. 1986; WILLERSON et al. 1989). Aktivierte Thrombozyten sezernieren zudem Serotonin. Thromboxan A₂ und Serotonin rufen im Bereich thrombotischer Plaques oder in embolischen Gefäßabschnitten eine Vasokonstriktion hervor. Dadurch induzieren Thrombozyten transiente Koronarspasmen, welche zur erheblichen Minderperfusion betroffener Myokardareale führen (MASERI et al. 1992).

Neben dem lokalen thrombotischen Ereignis im Hauptgefäß besteht die Möglichkeit, dass es durch Mikroembolisation thrombotischer Fragmente in die Peripherie zum Verschluss kleinerer Gefäße und zur Ischämie kleinerer Myokardareale ("minor myocardial injury") kommt (GAWAZ 1999).

Im Rahmen der Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms sind Thrombozyten neben der Bildung des thrombotischen Gefäßverschlusses, der Mikroembolisation und der Vasokonstriktion außerdem an der Plaqueprogression und systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt (GAWAZ 1999). So können an rupturierte Plaques angelagerte, jedoch klinisch inapparente Thrombozytenaggregate im Rahmen von Reparaturarbeiten organisiert werden und die Plaqueprogression fördern (FUSTER et al. 1992).

2.5.4 Die Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren für Thrombozyten

Thrombozyten exprimieren eine Vielzahl an Chemokinrezeptoren wie beispielsweise CCR1, CCR3, CCR4, CXCR4 und CX₃CR1 (CLEMETSON et al. 2000; SCHÄFER et al. 2004; MAKSYM et al. 2009). Maksym et al. (2009) beschreiben zudem eine CXCR7 Expression auf Thrombozyten. Dies konnte von unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (Daten nicht dargestellt). Dementsprechend ist beschrieben, dass Thrombozyten durch viele Chemokine aktiviert werden können (GEAR und CAMERINI 2003). Die Chemokine CCL17, CCL22 und CXCL12 sind in der Lage Thrombozyten über die Rezeptoren CCR4 und CXCR4 zu aktivieren und die Thrombozytenaggregation über CCR4 und CXCR4 zu verstärken. Außerdem induzieren sowohl CCL22 als auch CXCL12 die Expression des Membranglykoproteins P-Selektin auf Thrombozyten und fördern damit die Plättchenadhäsion auf immobilisiertem Kollagen beziehungsweise Fibrinogen unter Flussbedingungen (ABI-YOUNES et al. 2001; GEAR et al. 2001). Die Induktion der P-Selektin-Expression ist auch für das Chemokin CX₃CL1 via CX₃CR1 beschrieben (SCHÄFER et al. 2004). Bislang wurde nicht untersucht, ob die Chemokinrezeptoren CXCR7 und CXCR4 über die Bindung des Chemokins SDF-1 für die Adhäsion humaner Thrombozyten an Endotheldefekte *in vivo* eine Rolle spielen.

Ein Großteil der in α -Granula enthaltenen Proteine sind Chemokine, die als Antwort auf die Thrombozytenaktivierung innerhalb von Sekunden freigesetzt werden (KAPLAN et al. 1979; BRANDT et al. 2000). Zudem sind Thrombozyten in der Lage in anderen Zelltypen ebenfalls die Expression von Chemokinen zu induzieren (GEAR und CAMERINI 2003).

Von Thrombozyten stammende Chemokine spielen im Kontext der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle bezüglich Thrombose und Neointimaproliferation (HUO und LEY 2004; WEBER 2005).

2.6 Progenitorzellen

2.6.1 Herkunft und Morphologie der Progenitorzellen

Determinierte hämatopoetische Vorläuferzellen werden als Progenitorzellen bezeichnet. Progenitorzellen stammen von undeterminierten, pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab (*Abb. 8*). Stammzellen stellen die Grundform aller Zellen

sämtlicher Gewebe und Organe dar. Pluripotente Stammzellen als auch Progenitorzellen sind 12 µm große, morphologisch dichte, runde Zellen mit einem runden, stark basophilen Kern und einem schmalen basophilen Zytoplasma (LIEBICH 2004d).

In dieser Arbeit kommen endotheliale Progenitorzellen zum Einsatz, welche unter anderem den Stammzellmarker CD34 tragen. CD34 gilt als Marker für die frühe hämatopoetische Stammzellentwicklung (WEISSMANN 2000). Neben CD34 wird CD133 als ein weiterer wichtiger Stammzellmarker angesehen (YIN et al. 1997; MILLER-KASPRZAK und JAGODZINSKI 2007). Beide Marker können auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen exprimiert werden, wobei es überwiegend zu einer Überschneidung der CD34⁺ und CD133⁺ Populationen kommt (YIN et al. 1997; LANG et al. 2004; HICKS et al. 2007; WU et al. 2007). Da die Expression mit zunehmender Reife und Differenzierung abnimmt, handelt es sich bei Zellen, die beide Marker gleichzeitig tragen, um besonders unreife Zellpopulationen (PEICHEV et al. 2000).

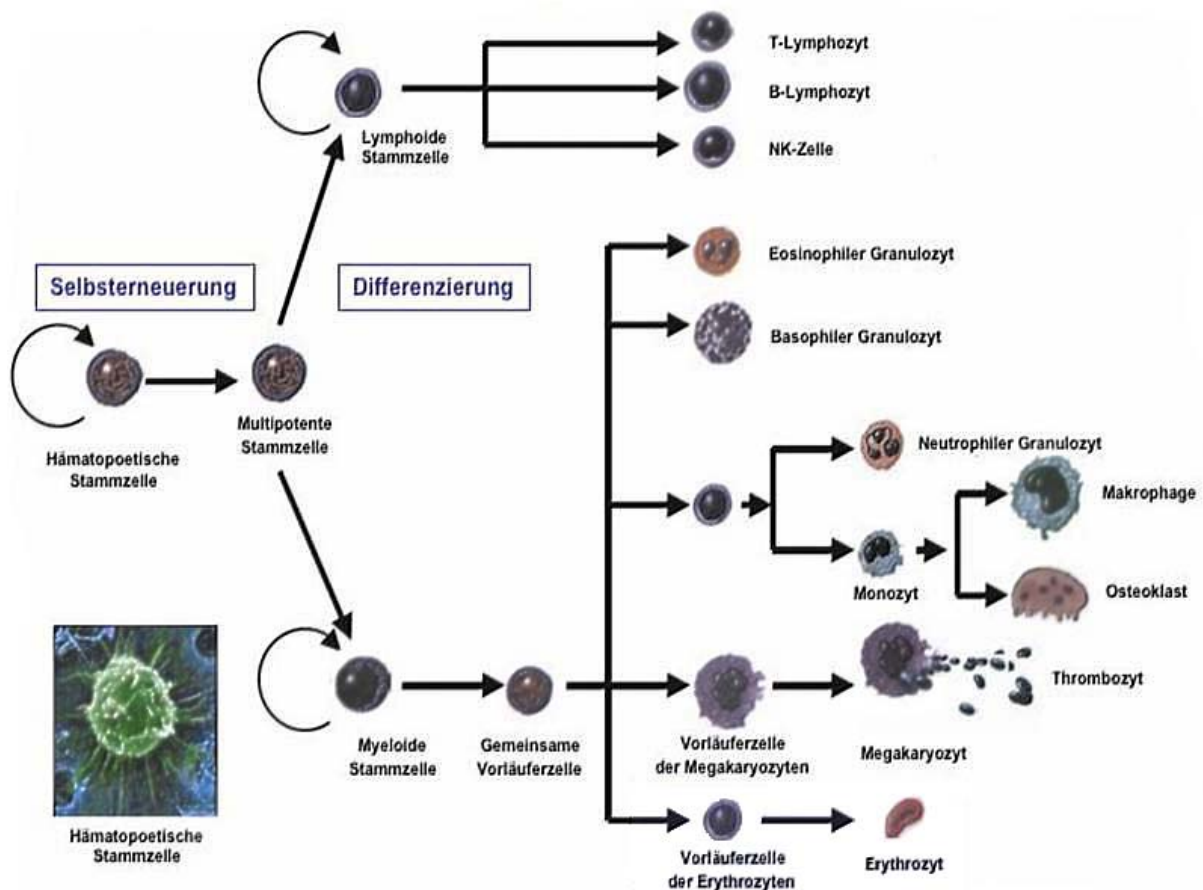


Abb. 8: Darstellung der Hämatopoese (modifiziert nach: http://www.uk-koeln.de/institute/kchemie/Lehre/Vorlesung/B_Erythropoese/B_text.html).

2.6.2 Die Interaktion von Progenitorzellen mit der Gefäßwand

Progenitorzellen exprimieren eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen, welche den Kontakt mit dem Endothel und anderen Zelltypen wie beispielsweise Thrombozyten vermitteln. Zu den Adhäsionsmolekülen zählen unter anderem Sialomucine, Selektine sowie Integrine (SIMMONS et al. 1997).

Bei Sialomucinen handelt es sich um Glykoproteine auf der Zelloberfläche. Das Sialomucin PSGL-1 auf Stammzellen interagiert mit P-Selektin auf aktivierten Thrombozyten sowie Endothelzellen und vermittelt den Vorgang des Rollens (ZANNETINO et al. 1995; LEVESQUE und SIMMONS 1999).

Auch der Stammzellmarker CD34, gehört zu den Sialomucinen und fungiert als Adhäsionsmolekül. CD34 vermittelt die Interaktion von Stammzellen mit Stromazellen und der extrazellulären Matrix des Knochenmarks (SATTERTHWAITE 1992; SIMMONS et al. 1992).

Unter den Selektinen, einer weiteren Familie von Adhäsionsrezeptoren, ist bislang P-, E- und L-Selektin bekannt (siehe Kapitel 2.5.2.1). Wie bereits erwähnt stellt PSGL-1 den Ligand für P- Selektin auf aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen dar. L-Selektin wird nicht nur auf Leukozyten, sondern auch auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und geht über diesen Rezeptor den Kontakt zu Endothelzellen ein (GONZALEZ-AMARO und SÁNCHEZ-MADRID 1999; SÁNCHEZ-MADRID und DEL POZO 1999). *In vivo*-Experimente mit blockierenden Antikörpern zeigten, dass neben P-Selektin auch E-Selektin an der initialen Bindung von endothelialen Progenitorzellen beteiligt ist (VAJKOCZY et al. 2003).

Die feste Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen erfolgt über Integrine (Definition siehe Kapitel 2.4.2). Für CD34⁺ Progenitorzellen spielen die Integrine $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) und $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5) eine Rolle, die beide an das Glykoprotein Fibronektin der extrazellulären Matrix binden. Für VLA-4 ist außerdem eine Bindung an VCAM-1 beschrieben. VCAM-1 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und wird von Endothelzellen sowie von Stromazellen exprimiert (LEVESQUE et al. 1995; LEVESQUE und SIMMONS 1999).

Von aktivierten Endothelzellen gebildetes SDF-1 ist in der Lage das Adhäsionsvermögen von VLA-4 und eines weiteren Integrins namens LFA-1 ($\alpha_M\beta_2$) auf CD34⁺ Progenitorzellen an

deren entsprechende endothelialen Liganden ICAM-1 beziehungsweise VCAM-1 zu erhöhen (PELED et al. 1999).

Für die feste Adhäsion von CD34⁺ Progenitorzellen an immobilisierte Thrombozyten spielen β_1 - und β_2 - Integrine eine maßgebliche Rolle (CHAVAKIS et al. 2005; DAUB et al. 2006; LANGER et al. 2006; HRISTOV et al. 2007b).

Außerdem ist eine Bindung von JAM-A auf CD34⁺ Progenitorzellen an den JAM-A-Rezeptor von Thrombozyten sowie an LFA-1 auf Endothelzellen beschrieben (STELLOS et al. 2010a). Bekannt ist auch die Interaktion zwischen dem Chemokin SDF-1 und dem CXCR4-Rezeptor auf CD34⁺ Progenitorzellen (siehe Kapitel 2.6.2) (STELLOS et al. 2008).

2.6.3 Die Funktion von Progenitorzellen

2.6.3.1 Die allgemeine Funktion von Progenitorzellen

Ein kleiner Pool von Progenitorzellen entwickelt sich nach mitotischen Teilungen pluripotenter Stammzellen als Tochterzellen, welche sich im Knochenmark kontinuierlich in Vorläuferzellen der myeloischen oder lymphatischen Zellreihe differenzieren und somit für die Hämatopoese verantwortlich sind. Aus diesen Zellreihen gehen ein Leben lang die im Blut zirkulierenden reifen Zellen hervor (*Abb. 8*) (WEISSMANN 2000; CHAN und WATT 2001; LIEBICH 2004d).

Im adulten Organismus befindet sich der überwiegende Anteil an Progenitorzellen als undifferenzierte hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Lediglich ein kleiner Anteil primitiver Stammzellen zirkuliert frei in der Blutbahn (MORRISON et al. 1995). Der Organismus zieht diese Zellen zur Erneuerung geschädigter Bereiche im Knochenmark und im Thymus heran (MORRISON et al. 1995; WRIGHT et al. 2001).

Diverse Einflussfaktoren wie Stress, Stimulation durch Zytokine, Entzündungen (beispielsweise im Rahmen atherosklerotischer Prozesse), ischämische Vorgänge (zum Beispiel beim akuten Koronarsyndrom) oder Trauma führen zu einer Mobilisierung aus dem Knochenmark und Rekrutierung von Progenitorzellen zum Ort des Geschehens. Dort findet nachfolgend deren Proliferation und Differenzierung statt (FU und LIESVELD 2000; LAPIDOT und PETIT 2002). Progenitorzellen fördern dadurch die strukturelle und funktionelle Wiederherstellung verschiedenster Organe wie Herz, Leber, Niere und Gehirn

(CANTLEY 2005; DIETRICH und KEMPERMANN 2006; MURRY et al. 2006; SHAFRITZ et al. 2006).

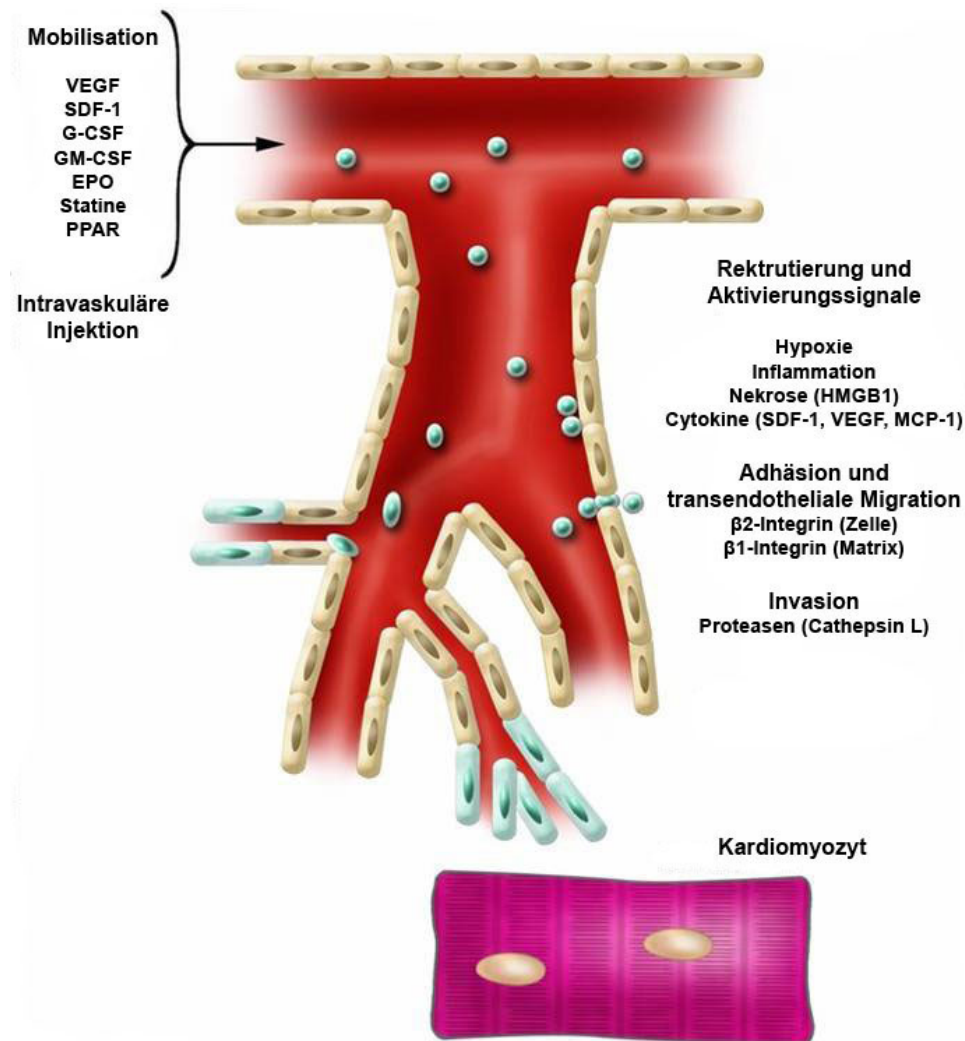


Abb. 9: Mobilisierung und Homing von Stammzellen (modifiziert nach Dimmeler et al. 2005).

Das "Homing" ins Zielgewebe ist ein mehrstufiger Prozess, der neben der Mobilisierung aus dem Knochenmark und der Rekrutierung, die Adhäsion sowie die transendotheliale Migration und Invasion beinhaltet (Abb. 9) (HRISTOV et al. 2003; DIMMELER et al. 2005). Bei der Stammzellmobilisierung müssen zunächst Bindungen, über die Stammzellen im Knochenmark verankert sind, gelöst werden. Stammzellen sind einerseits über das Adhäsionsmolekül VLA-4 mit VCAM-1 auf Stromazellen verbunden und andererseits über ihren CXCR4-Rezeptor mit SDF-1, welches von Endothelzellen und Osteoblasten des Knochenmarks exprimiert wird. Als Antwort auf eine Stimulation durch Zytokine (z.B. G-CSF, Granulocyte colony-stimulating factor) beziehungsweise Chemokine (z.B. IL-8) werden im Knochenmark proteolytische Enzyme (z.B. Elastasen, Cathepsin G, Metalloproteinasen)

freigesetzt, welche zum Abbau der Bindungsmoleküle und zum Remodeling der extrazellulären Matrix des Knochenmarks führen. Dies ermöglicht Stammzellen den Übertritt in die Blutbahn (PAPAYANNOPOULOU und NAKAMOTO 1993; PAPAYANNOPOULOU 2000; LEVESQUE et al. 2001; LAPIDOT und PETIT 2002).

2.6.3.2 Die Rolle von Progenitorzellen für die vaskuläre und myokardiale Regeneration

CD34⁺ Progenitorzellen, wie sie in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kommen, haben das Potential sich zu Endothelialen Progenitorzellen (EPC) zu differenzieren. Dieser Vorgang wird durch die Anwesenheit von Thrombozyten begünstigt (YEH et al. 2003; DAUB et al. 2006; LANGER et al. 2006; STELLOS et al. 2008). EPCs sind wiederum in der Lage sich zu Endothelzellen zu differenzieren. Funktionell gesehen sind daher CD34⁺ Progenitorzellen durch Neovaskularisierung und Angiogenese an der Gefäßregeneration beteiligt (ASHARA et al. 1997; TAKAHASHI et al. 1999; KALKA et al. 2000b; GILL et al. 2001; ASSMUS et al. 2002; RAFII und LYDEN 2003).

CD34⁺ Progenitorzellen beteiligen sich zudem an der myokardialen Regeneration nach Myokardinfarkt. Nach der Rekrutierung in geschädigte Myokardareale erfolgt deren Differenzierung in kardiale und vaskuläre Zellen (DIMMELER et al. 2005; NUMAGUCHI et al. 2006). Mit der transkoronaren beziehungsweise intrakoronaren Transplantation von Progenitorzellen nach akutem Myokardinfarkt kann eine marginale Verbesserung der Herzfunktion erzielt werden (STRAUER et al. 2002; SCHÄCHINGER et al. 2006).

Es kann beobachtet werden, dass Patienten mit einem erhöhten Risiko für koronare arterielle Herzerkrankungen eine kleinere Anzahl an zirkulierenden EPCs besitzen, die zusätzlich eine verringerte Aktivität aufweisen. Die Folgen sind neben einer verschlechterten Angiogenese eine Progression atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen (VASA et al. 2001; HILL et al. 2003).

2.6.4 Die Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren für Progenitorzellen

Chemokine und Chemokinrezeptoren leisten durch die Rekrutierung zirkulierender endothelialer Progenitorzellen, welche sich nachfolgend zu Endothelzellen differenzieren

können, ihren Beitrag zur vaskulären Regeneration (SCHOBER und ZERNECKE 2007). Nach drahtinduzierter Gefäßverletzung kann in der Arteria carotis communis der Maus das Chemokin CXCL7 nachgewiesen werden (HRISTOV et al. 2007a; HRISTOV et al. 2007b). Durch dessen Rezeptor CXCR2 vermittelt es die Rekrutierung und Adhäsion von endothelialen Progenitorzellen unter Flussbedingungen *in vitro* und *in vivo*. Das CXCL7-CXCR2-Paar beteiligt sich daher an der Wiederherstellung der vaskulären Integrität nach Gefäßverletzung und reduziert zudem die Hyperplasie der Neointima (LIEHN et al. 2004; HRISTOV et al. 2007a).

Immunkompetente Zellen sezernieren weitere Chemokine wie CCL2 (MCP-1), die zirkulierende endotheliale Progenitorzellen anlocken (FUJIYAMA et al. 2003).

Durch andere Chemokine wie IL-8 (Gro- α , Growth-regulated protein- α ; CXCL8), CXCL2 (Gro- β) und CCL3 (MIP-1 α , macrophage inflammatory protein-1) kann ebenfalls die Mobilisierung und Rekrutierung von Stammzellen herbeigeführt werden (FIBBE et al. 2000; KRONENWETT et al. 2000; KING et al. 2001). IL-8 induziert die Mobilisierung durch die Aktivierung des β_2 -Integrins LFA-1 (CD11a). Zudem beteiligen sich IL-8 und dessen Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 an der Rekrutierung intravenös applizierter CD34⁺ Progenitorzellen in Bereiche ischämischer Myokardareale (KOCHER et al. 2006; SCHÖMIG et al. 2006).

Auf die bedeutsame Rolle des Chemokins CXCL12 (SDF-1) und dessen Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen wird bereits in den Kapiteln 2.6.3.1, 2.7.3.1.2 und 2.8.3.4 ausführlich eingegangen. Im Gegensatz zu CXCR4 (STELLOS et al. 2008) ist für den CXCR7 Rezeptor bislang nicht geklärt, ob dieser einen Einfluss auf die Adhäsion humaner CD34⁺ Zellen an Endotheldefekte *in vivo* ausübt.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass VEGF (vascular endothelial growth factor), welches nicht der Familie der Chemokine, sondern der Familie der Wachstumsfaktoren angehört, ebenfalls eine hoch chemotaktische Wirkung auf endotheliale Progenitorzellen entfaltet (KALKA et al. 2000a).

2.7 Chemokine

2.7.1 Struktur und Nomenklatur von Chemokinen

Chemokine sind kleine Signalproteine aus der Gruppe der Zytokine, die als Liganden für Chemokinrezeptoren (siehe Kapitel 2.8) fungieren. Sie bestehen aus circa 75-125

Aminosäuren und weisen eine Molmasse von 8-10 kDa auf. Die Homologie der Gen- und Aminosäuresequenz liegt zwischen 20-50%. Die 3-dimensionale Tertiärstruktur ist innerhalb der Chemokine streng konserviert: Ein Chemokin besteht aus einem 3-strängigen antiparallelen β -Faltblatt und einem N-terminalen (Amino-Terminus) beziehungsweise C-terminalen (Carboxy-Terminus) Ende, dem eine α -Helix anhängt. Ein für die Struktur von Chemokinen weiterhin charakteristisches Merkmal ist das Vorhandensein von zwei bis vier Cysteinresten, die über intramolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Auf die beiden ersten Cysteine folgt ein sogenannter "N-Loop", dem sich eine 3_{10} -Helix anschließt. Die Helices und die drei Stränge des β -Faltblatts sind untereinander durch weitere Loops (30s, 40s, 50s) miteinander verbunden (FERNANDEZ und LOLIS 2002).

Die Anzahl und Position der Cysteinreste am N-Terminus geben an, um welchen Chemokintyp es sich handelt. Daraus leitet sich die systematische Nomenklatur der Chemokine ab, sodass die Familie der Chemokine in vier Unterfamilien unterteilt werden kann:

1. CC- Unterfamilie (β -Chemokine)
2. CXC- Unterfamilie (α -Chemokine)
3. CX₃C- Unterfamilie (δ -Chemokine)
4. C- Unterfamilie (γ -Chemokine)

Dabei stellen CC- und CXC-Chemokine die beiden Hauptgruppen dar. Die beiden anderen Unterfamilien bilden mit nur einem beziehungsweise zwei bekannten Vertretern Nebengruppen. CC-Chemokine zeichnen sich durch das direkte Aufeinanderfolgen der ersten beiden Cysteine am N-terminalen Ende aus, während bei CXC-Chemokinen diese beiden Cysteine durch eine variable Aminosäure (durch "X" repräsentiert) voneinander getrennt sind. Analog werden die ersten beiden Cysteine der CX₃C-Unterfamilie durch drei Aminosäuren getrennt. C-Chemokine tragen lediglich ein Cystein am Amino-Terminus.

Die Namen der einzelnen Chemokine setzen sich folgendermaßen zusammen: Der Bezeichnung der Unterfamilie wird ein "L" für Ligand und eine fortlaufende Nummerierung angehängt (zum Beispiel: CCL-1 oder CXCL2).

(MURPHY et al. 2000; ZLOTNIK und YOSHIE 2000; LOETSCHER und CLARK-LEWIS 2001; MURPHY 2002)

1. CC-Chemokine

Zu den CC-Chemokinen gehört eine Vielzahl von Vertretern. CCL2 (MCP-1) beispielsweise steuert die Migration von Monozyten (GAWAZ et al. 1998), während andere Vertreter dieser Unterfamilie, wie zum Beispiel CCL5 (RANTES), eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten entfalten (HUO et al. 2003; VON HUNDELSHAUSEN et al. 2005).

2. CXC-Chemokine

CXC-Chemokine können wiederum in zwei Untergruppen, ERL-positive (Aminosäuresequenz mit der Abfolge "Glu-Leu-Arg") und ERL-negative CXC-Chemokine, unterteilt werden. Das ERL-Motiv ist ein Charakteristikum derjenigen Chemokine, welche an die Rezeptoren CXCR1 und/oder CXCR2 binden (CLARK-LEWIS et al. 1993).

Chemokine mit ERL-Motiv fördern die Angiogenese. ERL-negative Chemokine wirken dagegen meist anti-angiogenetisch (STRIETER et al. 1995).

3. CX₃C-Chemokine

Für die CX₃C-Unterfamilie gibt es bisher nur einen bekannten Vertreter, namens Fraktalkin (CX₃CL1). Dieses Chemokin wird unter anderem von aktivierten Endothelzellen exprimiert und ist in erster Linie an der Migration von T-Lymphozyten und Monozyten beteiligt (BAZAN et al. 1997; IMAI et al. 1997).

4. C-Chemokine

Die Unterfamilie der C-Chemokine stellt mit bisher zwei bekannten Vertretern ebenfalls eine Nebengruppe dar. Beschrieben sind derzeit XCL1 (Lymphotactin- α) (KELNER et al. 1994) und XCL2, auch Lymphotactin- β genannt. Eine chemotaktische Aktivität wird hauptsächlich auf Lymphozyten und natürliche Killerzellen ausgeübt (KENNEDY et al. 1995; GIANCARLO et al. 1996).

Aufgrund ihrer Funktion und des Expressionsmusters ist überdies eine Einteilung in inflammatorische, homeostatische und inflammatorisch-homeostatische Chemokine (MOSER et al. 2004) möglich. Die Freisetzung inflammatorischer Chemokine wird durch proinflammatorische Stimuli induziert und führt zur Rekrutierung von Immunzellen an den Ort des Entzündungsgeschehens. Homeostatische Chemokine dagegen werden konstitutiv exprimiert und nehmen über die Steuerung von Leukozyten eine wichtige Rolle bei der immunologischen Überwachung ein (MOSER und LOETSCHER 2001).

2.7.2 Die Funktion von Chemokinen

Die Hauptfunktion der Chemokine und ihren entsprechenden Chemokinrezeptoren ist die Chemotaxis von Blutzellen, das bedeutet, die zielgerichtete Wanderung von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration (ZLOTNIK und YOSHIE 2000; SCHIER 2003).

Leukozyten können unter dem Einfluss von Chemokinen aktiv die Blutbahn verlassen (Extravasation). Außerdem bewirken Chemokine die Migration von immunologischen Zellen im umliegenden Gewebe zum Ort des Entzündungsgeschehens. Überdies ist durch Chemokine die Rekrutierung von Lymphozyten in lymphatische Organe möglich (BLEUL et al. 1996a; MOSER et al. 2004). Chemokine spielen somit eine Schlüsselrolle bei der immunologischen Abwehr (ZLOTNIK und YOSHIE 2000; CAMPBELL et al. 2003).

Für einige Chemokine ist beschrieben, dass sie das Überleben von Zellen und deren Wachstum beeinflussen (HORUK 2001).

Außerdem sind Chemokine, wie beispielsweise CXCL12, unerlässlich für die Embryogenese, Organogenese, Hämatopoese (NAGASAWA et al. 1996; MA et al. 1998; ZOU et al. 1998; BAGRI et al. 2002; DOITSIOU et al. 2002) und (Tumor-) Angiogenese (LIANG et al. 2007).

2.7.3 Die Chemokine CXCL12/SDF-1 und CXCL11/I-TAC

Da in der vorliegenden Arbeit das Augenmerk neben CXCR4 in erster Linie auf dem Chemokinrezeptor CXCR7 liegt, dessen Liganden CXCL12/SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) und CXCL11/I-TAC (Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant) sind, werden im Folgenden diese beiden Chemokine näher beschrieben.

2.7.3.1 SDF-1/CXCL12

2.7.3.1.1 Die Bezeichnung und Struktur von SDF-1/CXCL12

Bei SDF-1/CXCL12 handelt es sich um ein Chemokin aus der Chemokinunterfamilie mit CXC-Motiv (Nomenklatur der Chemokine siehe Kapitel 2.7.1). Die 3-dimensionalen Struktur von CXCL12 entspricht dem allgemeinen Aufbau eines Chemokins wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben. Die ersten beiden Cysteine am N-terminalen Ende sind durch eine Aminosäure voneinander getrennt (SHIROZU et al. 1995). *Abb.10* zeigt den Aufbau von CXCL12.

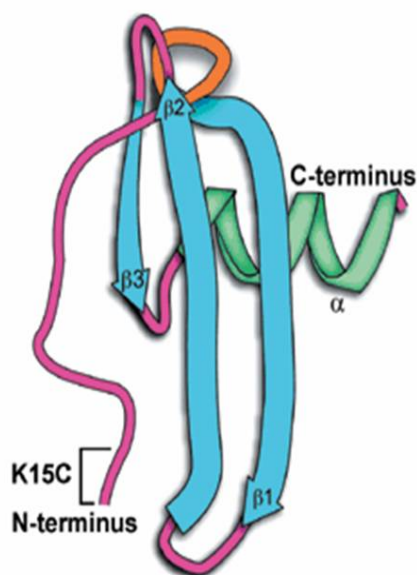


Abb. 10: Aufbau von SDF-1/CXCL12 (nach Watt und Forde 2008).

CXCL12 wurde ursprünglich in einer Bindegewebszelllinie ("stromal cell line") des murinen Knochenmarks entdeckt (TASHIRO et al. 1993), woraus sich die synonyme Bezeichnung SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) ableitet. Die zweite Bezeichnung PBSF (pre-B cell growth-stimulating factor) erklärt sich aus seiner Eigenschaft, B-Vorläuferzellen *in vitro* zur Differenzierung in B-Zellen zu stimulieren (NAGASAWA et al. 1994).

Das Gen, welches für das 8 kDA große und 72 Aminosäuren lange humane SDF-1 codiert, ist auf Chromosom 10 lokalisiert. Mit einer nahezu identischen Aminosäurestruktur sind das murine und humane SDF-1 zu 99% homolog (SHIROZU et al. 1995). SDF-1 kann in verschiedenen, durch alternatives Splicing desselben Gens gebildeten, Isoformen auftreten, wobei SDF-1 α und SDF-1 β als die physiologisch bedeutsamsten Isoformen gelten (SHIROZU et al. 1995; DE LA LUZ SIERRA et al. 2004; YU et al. 2006). Diese beiden Splicing-Varianten sind durch ihre unterschiedlichen Aktivitäten gekennzeichnet (JANOWSKI 2009). Bei SDF-1 α handelt es sich um die im Organismus vorherrschende Form, die, verglichen mit SDF-1 β , empfindlicher gegenüber einer proteolytischen Zersetzung im Blut ist. In der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden die Bezeichnung SDF-1 verwendet, womit stets SDF-1 α gemeint ist.

SDF-1 gilt als natürlicher Ligand für die beiden G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren CXCR4 (BLEUL et al. 1996b) und CXCR7 (BURNS et al. 2006) (siehe Kapitel 2.8.3).

2.7.3.1.2 Die Expression und Funktion von SDF-1/CXCL12

Das Chemokin CXCL12/SDF1 wird von nahezu allen Organ- und Gewebstypen konstitutiv exprimiert (SHIROZU et al. 1995; YU et al. 2006), so beispielsweise von Endothelzellen (NAGASAWA et al. 1994; IMAI et al. 1999; PONOMARYOV et al. 2000, CERADINI et al. 2004) und von Fibroblasten/Osteoblasten, einer Vielzahl von Organen wie dem Herzen (ASKARI et al. 2003), der Skelettmuskulatur (RATAJCZAK et al. 2003), der Leber (KOLLET et al. 2003), dem Gehirn (ZOU et al. 1998) und der Niere (SCHRADER et al. 2002). Die höchste SDF-1 Konzentration befindet sich im Knochenmark (PONOMARYOV et al. 2000). SDF-1 kommt beispielsweise auch auf glatten Muskelzellen und auf Makrophagen vor (GEAR und CAMERINI 2003). Große Mengen an SDF-1 sind in Thrombozyten gespeichert, welches infolge einer Thrombozytenaktivierung oder Plättchenadhäsion an Gefäßdefekte auf der Zelloberfläche exprimiert wird (JIN et al. 2006a; MASSBERG et al. 2006; STELLOS et al. 2008). Pathologischerweise wird SDF-1 auch in atherosklerotischen Gefäßabschnitten gebildet (ABI-YOUNES et al. 2001). Zudem kann eine erhöhte SDF-1 Sekretion bei einem Gewebeschaden, zum Beispiel nach Myokardinfarkt (ASKARI et al. 2003; ABBOTT et al. 2004; WOJAKOWSKI et al. 2004; WEI et al. 2007) und nach Hinterlaufischämie (TAKAHASHI et al. 1999), beobachtet werden.

SDF-1 gilt als das potenteste Chemokin für Stamm- und Progenitorzellen sowie für Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten (BLEUL et al. 1996a; AIUTI et al. 1997).

Zu den biologischen Aufgaben dieses Chemokins gehört die Fähigkeit, Prozesse wie Chemotaxis, Adhäsion, Zellmotilität sowie die Sekretion von MMPs (Matrixmetalloproteinasen) und angiogenetischen Faktoren zu induzieren (KUCIA et al. 2004). So können Endothelzellen durch SDF-1 direkt zur Migration angeregt werden und die Angiogenese fördern (SALCEDO und OPPENHEIM 2003). SDF-1 stellt einen Schlüsselregulator der Hämatopoese dar, was SDF-1-Knockout-Mäuse mit gestörter Myelopoese und Lymphopoese zeigen (NAGASAWA et al. 1996; MA et al. 1998). Überdies ist SDF-1 für die Mobilisierung und zielgerichtete Wanderung von hämatopoetischen Stammzellen in das periphere Blut (AIUTI et al. 1997) und der Verankerung von Stammzellen in Speicherorten wie dem Knochenmark (LAPIDOT und PETIT 2002) verantwortlich. Davon abgesehen, dass SDF-1 in der Lage ist Progenitorzellen an geschädigte Gefäßabschnitte zu rekrutieren (MASSBERG et al. 2006; HRISTOV et al. 2007b), fördert SDF-1 die Differenzierung von CD34⁺ Progenitorzellen zu Endothelzellen *in vitro*

(STELLOS et al. 2008). Wie in drahtinduzierten Verletzungsmodellen der Arteria carotis communis der Maus gezeigt wird, scheint SDF-1 durch die Rekrutierung von Vorläuferzellen glatter Muskelzellen aus dem Knochenmark aber auch eine entscheidende Rolle bei der Neointimabildung einzunehmen (SCHÖBER et al. 2003; ZERNECKE et al. 2005).

SDF-1 entfaltet zudem eine hoch chemotaktische Wirkung auf Leukozyten und ist an deren Rekrutierung und Migration maßgeblich beteiligt (BLEUL et al. 1996a).

Außerdem spielt SDF-1 eine herausragende Rolle bei der Entwicklung von Organen wie beispielsweise des kardiovaskulären Systems (SIERRO et al. 2007; GERRITS et al. 2008) und des Gehirns (MA et al. 1998; ZOU et al. 1998).

In Kapitel 2.8.3.4 wird im Zusammenhang mit der SDF-1/CXCR4 und der SDF-1/CXCR7 Achse näher auf die Funktionen von SDF-1 eingegangen.

2.7.3.2 I-TAC/CXCL11

2.7.3.2.1 Die Bezeichnung und Struktur von I-TAC/CXCL11

Bei CXCL11 handelt es sich um ein Chemokin aus der Chemokinunterfamilie mit CXC-Motiv (Nomenklatur der Chemokine siehe Kapitel 2.7.1). Das für CXCL11 codierende Gen wurde ursprünglich durch cDNA-Sequenzanalysen humaner, Cytokin-aktivierter Astrozyten identifiziert. Synonym verwendet werden die Bezeichnungen I-TAC (Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant) und IP-9 (Interferon-gamma-inducible protein 9) (COLE et al. 1998), da die Genexpression von CXCL11 durch Interferone (IFN), vor allem durch IFN- γ und IFN- β , induziert werden kann (RANI et al. 1996). In dieser Arbeit wird im Folgenden die Bezeichnung I-TAC verwendet. Das Gen für I-TAC ist, zusammen mit einer Vielzahl anderer Chemokine, welche der CXC-Chemokin-Unterfamilie angehören, auf dem humanen Chromosom 4 lokalisiert (ERDEL et al. 1998; O'DONOVAN et al. 1999). Die 3-dimensionale Struktur von I-TAC entspricht dem allgemeinen Aufbau eines Chemokins (siehe Kapitel 2.7.1). Die ersten beiden Cysteine am N-terminalen Ende sind durch eine Aminosäure voneinander getrennt. CXCL11 weist eine hohe Affinität zu den Chemokinrezeptoren CXCR3 (TENSEN et al. 1999) und CXCR7 (BURNS et al. 2006) auf.

2.7.3.2.2 Die Expression und Funktion von I-TAC/CXCL11

Das Chemokin I-TAC/CXCL11 wird von Leukozyten des peripheren Blutes, wie beispielsweise Monozyten, und in einer Vielzahl von Organen, wie Pankreas, Lunge, Thymus und Milz exprimiert (COLE et al. 1998).

I-TAC übt eine starke Chemotaxis auf Interleukin-2-aktivierte T-Lymphozyten aus und beteiligt sich dadurch an der Pathophysiologie inflammatorischer und immunologischer Prozesse (COLE et al. 1998).

2.8 Chemokinrezeptoren

2.8.1 Struktur und Nomenklatur von Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren sind Zellmembran-gebundene Moleküle, die an G-Proteine binden. Sie gehören zur Rhodopsin-Unterfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bestehen aus circa 350 Aminosäuren. Strukturell gesehen weisen Chemokinrezeptoren wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sieben α -helikale transmembranäre Domänen mit jeweils drei extra- und intrazellulären Schleifen, sowie einen aziden extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus auf. Die erste und zweite extrazelluläre Schleife beinhaltet hoch konservierte Cysteine, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Im C-Terminus sind Serin- und Threoninreste lokalisiert, welche als Phosphorylierungsstellen für die Regulation des Rezeptors dienen.

Chemokinrezeptoren sind in der Lage über das N-terminale Ende ligandenspezifisch ein spezielles Chemokin oder unterschiedliche Chemokine zu binden. Über das C-terminale Ende erfolgt die Kopplung an intrazellulär gelegene heterotrimere G-Proteine der G_i -Familie, worüber die Signaltransduktion der Zelle („receptor-signaling“) stattfindet. (BAGGIOLINI et al. 1997; MURDOCH und FINN 2000; PIERCE et al. 2002; FREDRIKSSON et al. 2003).

Die systematische Nomenklatur der Chemokinrezeptoren ergibt sich folgendermaßen: Der Kurzbezeichnung einer der vier Chemokin-Unterfamilien (CC, CXC, CX₃C, XC) wird ein "R" für Rezeptor und eine fortlaufende Nummerierung angehängt. (zum Beispiel: CXCR7 oder CCR2) (MURPHY et al. 2000; MURPHY 2002).

2.8.2 Funktion und Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren

Die Hauptaufgabe der Chemokinrezeptoren und ihrer Chemokinliganden besteht in der zielgerichteten Steuerung von Leukozyten und anderer Blutzellen unter homeostatischen und inflammatorischen Bedingungen (BAGGIOLINI 1998; CYSTER 1999a, CYSTER 1999b; WARD et al. 1998).

Sobald eine Bindung zwischen Chemokinrezeptor und dessen Ligand zustande kommt, werden verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege in Gang gesetzt, die zu funktionellen "Zellantworten" wie zum Beispiel Chemotaxis, Sekretion und Transkription führen (THELEN 2001).

Die Signaltransduktion erfordert die Kopplung an intrazellulär gelegene heterotrimere G-Proteine, bestehend aus drei Untereinheiten, α , β , γ . G-Proteine sind inaktiv, solange GDP (Guanosindiphosphat) an die α -Untereinheit gebunden ist. Das G-Protein wechselt in den aktiven Zustand, wenn GDP zu GTP (Guanosintriphosphat) umgewandelt wird. Die Überführung in GTP wird durch die Bindung des Liganden und die nachfolgende Interaktion des Chemokinrezeptors mit dem G-Protein begünstigt. Im aktiven Zustand dissoziiert das G-Protein in seine Untereinheiten. Daraufhin bewirken die α - und β - Untereinheit die Aktivierung diverser Enzyme. Die β - Untereinheit ist in der Lage ein membranständiges Enzym namens PLC β 2 (Phospholipase C β 2) zu aktivieren, welches wiederum das Phospholipid PIP $_2$ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) in IP $_3$ (Phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphat) und DAG (Diacyl-Glycerol) spaltet. IP $_3$ und DAG sind intrazelluläre "Second-Messenger". Während IP $_3$ aus intrazellulären Speichern Calcium mobilisiert, aktiviert DAG die so genannte PKC (Proteinkinase C) und weitere Calcium-abhängige Proteinkinasen. Proteinkinasen katalysieren die Phosphorylierung von Proteinen, wodurch in der Zelle eine Reihe von Signalvorgängen in Gang gesetzt wird. Außerdem wird durch das freigesetzte Calcium das Enzym PLD (Phospholipase D) aktiviert. (WU et al. 1993; BOKOCH 1995; KUANG et al. 1996; MURPHY 1996).

Ein anderer Signalweg kann über die Aktivierung der PTK (Proteintyrosinkinase) durch die α -Untereinheit eingeschlagen werden. Die PTK aktiviert daraufhin die MAPK (mitogen-activated protein kinase), die ihrerseits die PLA $_2$ (Phospholipase A $_2$) aktiviert (MURPHY 1996).

Sowohl DAG, intrazelluläres Calcium, PKC, als auch PLA $_2$ sorgen für spezifische Zellaktivierungsmechanismen, beispielsweise in Form von Zellmotilität, -degranulation, oder -adhäsion über Integrine.

2.8.3 Die Chemokinrezeptoren CXCR7 und CXCR4

2.8.3.1 Struktur und Liganden der Rezeptoren CXCR7 und CXCR4

Bei dem Rezeptor CXCR4 handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor aus der Familie der Chemokinrezeptoren (*Abb. 11*). Wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besteht dieser aus sieben Transmembrandomänen mit je drei extrazellulären und intrazellulären Schleifen sowie einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-terminalen Ende (siehe Kapitel 2.8.1). (JOOST und METHNER 2002; PIERCE et al. 2002; FREDRIKSSON et al. 2003). Auch der CXCR7-Rezeptor wird aufgrund seiner Struktur den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet, obwohl eine Signaltransduktion über G-Proteine umstritten ist (siehe Kapitel 2.8.3.5).

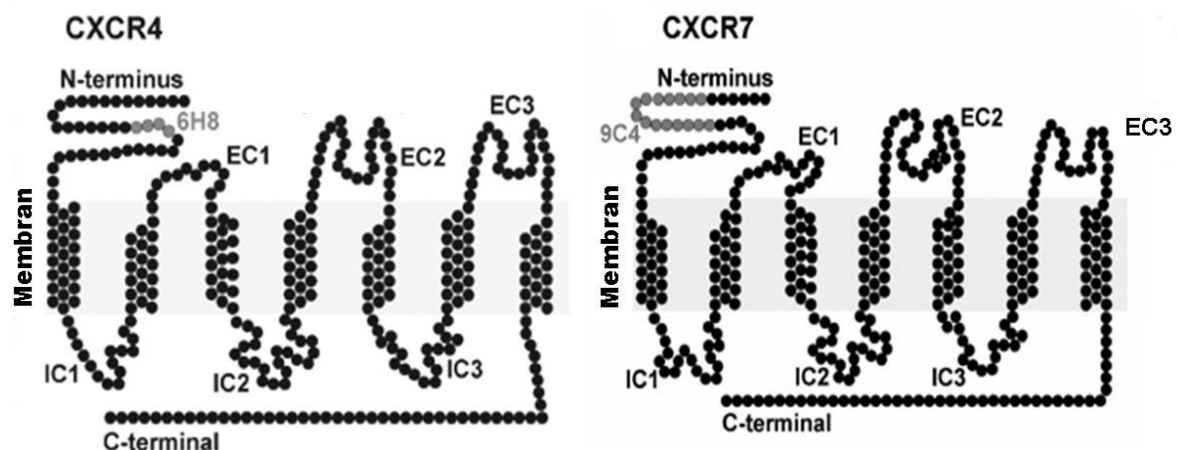


Abb. 11: Struktur der Chemokinrezeptoren CXCR4 (links) und CXCR7 (rechts) (modifiziert nach Watt und Forde 2008).

Der natürliche Chemokinligand der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 ist CXCL12 (SDF-1). Dabei weist CXCL12 eine zehnfach höhere Affinität zu CXCR7 auf als zu CXCR4. Einen weiteren Bindungspartner von CXCR7 stellt CXCL11 (I-TAC) dar. Beide Liganden, CXCL12 und CXCL11, sind inflammatorische und "homing" Chemokine aus der Chemokinunterfamilie mit CXC-Motiv (BLEUL et al. 1996b; MOSER et al. 2004; BALABANIAN et al. 2005; BURNS et al. 2006).

2.8.3.2 Die Entdeckung des CXCR7- und CXCR4- Rezeptors

Der erstmals von Federspiel et al. (1993) als „HUMSTR“ und von Loetscher et al. (1994) als „LESTR“ beschriebene Chemokinrezeptor erhält später, entsprechend der für Chemokinrezeptoren vereinbarten Nomenklatur, die Neubezeichnung „CXCR4“ (BLEUL et al. 1996b). Dieser Rezeptor fungiert als Co-Rezeptor für HIV (human immunodeficiency virus) (FENG et al. 1996) und wird in diesem Zusammenhang „Fusin“ genannt.

CXCR4 galt zunächst als einziger Rezeptor für das Chemokin SDF-1/CXCL12 (BLEUL et al. 1996b; OBERLIN et al. 1996). Diese Annahme konnte widerlegt werden, als Burns et al. (2006) zeigten, dass murine fetale Leberzellen von CXCR4 Knockout Mäusen nach wie vor SDF-1 binden. So wurde vor einigen Jahren gezeigt, dass SDF-1 an einen zweiten Rezeptor bindet, an den RDC1-Rezeptor, welcher später, gemäß der konventionellen Nomenklatur für Chemokinrezeptoren, die Neubezeichnung „CXCR7“ erhält (BALABANIAN et al. 2005; BURNS et al. 2006).

Die Nukleotidsequenz des RDC1-Gens wurde ursprünglich vor circa 20 Jahren aus einer caninen Genbank (Receptor Dog cDNA) gewonnen (LIBERT et al. 1990). Man hielt den RDC1-Rezeptor (CXCR7-Rezeptor) zunächst für einen vermeintlich neuen G-Protein gekoppelten Rezeptor für das VIP (vasoaktives intestinales Peptid) (LIBERT et al. 1991). Eine Bindung des VIPs an CXCR7 konnte jedoch kurze Zeit später nicht bestätigt werden (COOK et al. 1992; NAGATA et al. 1992). Auch die Annahme von Autelitano (1998), CXCR7 fungiere als Adrenomedullinrezeptor, wurde einige Jahre später widerlegt (CUEILLE et al. 2002).

Die Ursache dafür, dass CXCR7 mit Chemokinrezeptoren in Verbindung gebracht wird, beruht auf der Tatsache, dass die Gensequenz eine 43%-ige Ähnlichkeit mit der des Chemokinrezeptors CXCR2 aufweist und zu 32% mit der Aminosäuresequenz von CXCR2 übereinstimmt. Bezüglich der Lokalisation befindet sich das Gen in der Nähe des cxcr4-, cxcr2- und cxcr1-Gens auf dem murinen Chromosom 1 (HEESEN et al. 1998; MOEPPS et al. 2006). Eine ähnliche Genorganisation findet sich im humanen Genom auf Chromosom 2 (LIBERT et al. 1991). CXCR7 gilt als phylogenetisch hoch konserviertes Protein mit einer strukturellen Übereinstimmung von >91% zwischen Säugerspezies wie Mensch, Hund, Maus und Ratte (HEESEN et al. 1998; SHIMIZU et al. 2000; BURNS et al. 2006).

Phylogenetische Studien von über 340 humanen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren belegen, dass CXCR7 zur Subfamilie „A2“ der Familie der Rhodopsin-ähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren („Rhodopsin-like-receptors“) gehört (JOOST und METHNER 2002; FREDRIKSSON et al. 2003).

2.8.3.3 Die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR7 und CXCR4

Aus der Literatur ist bekannt, dass CXCR4 im Vergleich zu anderen Chemokinrezeptoren auf fast allen Gewebs- und Zelltypen exprimiert wird. Neben Zellen des blutbildenden Systems wie beispielsweise Thrombozyten (WANG et al. 1998; KOWALSKA et al. 1999) kommt CXCR4 auf Endothelzellen (GUPTA et al. 1998; TACHIBANA et al. 1998; VOLIN et al. 1998; MURDOCH et al. 1999a) sowie Epithelzellen (MURDOCH et al. 1999b) und insbesondere auf CD34⁺ Progenitorzellen (AIUTI et al. 1997) und Tumorzellen (MÜLLER et al. 2001; LIBURA et al. 2002; HARTMANN et al. 2005; KUCIA et al. 2005) vor. Auch Zellen des Zentralen Nervensystems und des Gastrointestinaltrakts gelten als CXCR4 positiv (ZOU et al. 1998; NAGASAWA 2001).

CXCR7 zeigt ebenfalls eine weite Verbreitung im Organismus, wobei die Expression auf RNA- und Proteinebene variiert. Der Rezeptor kann innerhalb des blutbildenden Systems auf humanen Thrombozyten (MAKSYM et al. 2009), auf humanen Leukozyten wie Monozyten, reifen B-Lymphozyten (z.B. CD19⁺, CD20⁺), CD4⁺ T-Lymphozyten, basophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen, unreifen Dendritischen Zellen (INFANTINO et al. 2006), neutrophilen Granulozyten (HEESEN et al. 1998) sowie auf CD3⁺ T-Lymphozyten (BALABANIAN et al. 2005) nachgewiesen werden. Auch humane renale multipotente Progenitorzellen (MAZZINGHI et al. 2008) und humane CD34⁺ Stammzellen (HARTMANN et al. 2008) sind CXCR7 positiv.

Des Weiteren findet sich CXCR7 in einer Vielzahl von Organen und Geweben wie Niere, Milz (HEESEN et al. 1998), Leber, Lunge (BURNS et al. 2006), Herz (HEESEN et al. 1998; BURNS et al. 2006), Dünndarm, Colon (SREEDHARAN et al. 1993), Hoden (EVA und SPRENGEL 1993), Gehirn (SCHÖNEMEIER et al. 2008b) und in Lymphatischen Organen (HEESEN et al. 1998; BURNS et al. 2006; INFANTINO et al. 2006; SIERRO et al. 2007). CXCR7 wird darüber hinaus in Chondrozyten (JONES et al. 2006), in Osteozyten (JONES et al. 2006; GERRITS et al. 2008), in Fibroblasten und Astrozyten des Gehirns (SREEDHARAN et al. 1993; SHIMIZU et al. 2000), und auf Endothelzellen (SIERRO et al. 2007; GERRITS et al. 2008; MAZZINGHI et al. 2008) exprimiert. Außerdem sind viele

Tumor versorgende Blutgefäße, genauer gesagt die Endothelzellen, CXCR7 positiv (MADDEN et al. 2004; MIAO et al. 2007).

Zudem kann CXCR7 auf einigen Tumorzelllinien (BURNS et al. 2006; MIAO et al. 2007) und primären humanen Tumoren nachgewiesen werden, wie zum Beispiel auf Lungenkarzinomen (GOLDMANN et al. 2008; IWAKIRI et al. 2009), Mammatumoren (MEIJER et al. 2008), Prostatakarzinomen (WANG et al. 2008a), Colonkarzinomen (MEIJER et al. 2008), Hypophysenadenomen (YOSHIDA et al. 2009) und Hirntumoren (SALMAGGI et al. 2009).

Des Weiteren findet sich CXCR7 in der Organanlage des Zebrafischs (DAMBLY-CHAUDIÈRE et al. 2007; VALENTIN et al. 2007; BOLDAJIPPOUR et al. 2008).

Auf die Bedeutung wird in diesem Zusammenhang in Kapitel 2.8.3.4 näher eingegangen.

2.8.3.4 Die Funktion der CXCR7/SDF-1- und der CXCR4/SDF-1 -Achse

Der Chemokinrezeptor CXCR4 und das Chemokin SDF-1/CXCL12 wurden lange Zeit für ein "monogames" Rezeptor-Ligand Paar gehalten (BLEUL et al. 1996b). Diese Annahme beruhte auf der Tatsache, dass SDF-1 beziehungsweise CXCR4-defiziente Mäuse ähnliche phänotypische Merkmale aufweisen. Dabei handelt es sich neben Ventrikel-Septum Defekten des Herzens und Missbildungen des Kleinhirns um eine beeinträchtigte Hämatopoese und Neoangiogenese. Die embryonale Letalität liegt bei SDF-1- und CXCR4- Knockout Mäusen zwischen dem 15. und 18. Embryonaltag (NAGASAWA et al. 1996; MA et al. 1998; TACHIBANA et al. 1998; ZOU et al. 1998).

Seitdem bekannt ist, dass SDF-1 nicht nur an CXCR4, sondern auch an den Chemokinrezeptor CXCR7 bindet (BURNS et al. 2006), liegt auch die CXCR7/SDF-1-Achse im Interesse der Forschung. Nachfolgend wird die bedeutsame Rolle beider Achsen für physiologische und pathologische Prozesse näher erläutert, wobei der Schwerpunkt in dieser Arbeit auf der SDF-1/CXCR7- Achse liegt.

Mobilisierung und Rekrutierung von Stammzellen:

Während der Embryonalentwicklung ist von Stromazellen des Knochenmarks sezerniertes SDF-1 für die Besiedlung des Knochenmarks mit hämatopoetischen Stammzellen aus der fetalen Leber zuständig (DAVID et al. 2002; LAPIDOT und PETIT 2002; KORTESIDIS et al. 2005). Im adulten Organismus sorgt SDF-1 für das "Homing" von Stammzellen ins

Knochenmark und deren Verankerung im Knochenmark (AIUTI et al. 1997; KIM und BROXMEYER 1998; LAPIDOT und PETIT 2002; GUO et al. 2005). Dementsprechend spielt die CXCR4/SDF-1-Achse eine essentielle Rolle für die Mobilisierung und Rekrutierung von hämatopoetischen Stamm-/Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut (AIUTI et al. 1997; DEVINE et al. 2004; PAPAYANNOPOULOU 2004; LAPIDOT et al. 2005; PELUS und FUKUDA 2008).

Durch eine vermehrte SDF-1 Expression in geschädigten Organen (wie beispielsweise im Herzen post Myokardinfarkt) werden zirkulierende CXCR4⁺ Stammzellen rekrutiert, mit dem Ziel, sich an der Regeneration des Gewebes zu beteiligen (DALAKAS et al. 2005; KIJOWSKI et al. 2005; KUCIA et al. 2006; RATAJCZAK et al. 2006a; RATAJCZAK et al. 2006b; MAJKA und RATAJCZAK 2006; WOJAKOWSKI et al. 2006).

Corezeptoren für HIV-Stämme:

CXCR4 fungiert als Co-Rezeptor für HIV (human immunodeficiency virus) (FENG et al. 1996; OBERLIN et al. 1996). Durch SDF-1 kann die HIV-Infektion diverser Zelllinien sowie die Replikation des Virus inhibiert werden (BLEUL et al. 1996b).

Shimizu et al. (2000) zeigten, dass CXCR7 wie viele andere Chemokinrezeptoren (ALKHATIB et al. 1996; CHOE et al. 1996; CHEN et al. 1997; REEVES et al. 1997) auch als Co-Rezeptor für gewisse HIV- und zudem für SIV- (simian immunodeficiency virus) Stämme fungieren kann, was die Zugehörigkeit des Rezeptors zu den Chemokinrezeptoren bestätigt.

Tumorproliferation, -metastasierung und -angiogenese:

Sowohl CXCR4, als auch SDF-1 sind an der Tumorproliferation (KIJIMA et al. 2002; BERTOLINI et al. 2002), -metastasierung (MÜLLER et al. 2001) und -angiogenese (ORIMO et al. 2005) beteiligt. CXCR4⁺ Tumorzellen metastasieren in SDF-1 exprimierende Organe (RATAJCZAK et al. 2006a, RATAJCZAK et al. 2006b; YASUOKA et al. 2008). Durch eine Antagonisierung des CXCR4-Rezeptors kann *in vivo* das Wachstum diverser Tumoren gehemmt werden (RUBIN et al. 2003). Auch CXCR7 nimmt eine herausragende Rolle in der Tumorgenese ein. CXCR7 fördert beispielsweise das Tumorwachstum bei Nacktmäusen (RAGGO et al. 2005), übt anti-apoptotische Effekte (INFANTINO et al. 2006) in Tumorzellen aus und sichert deren Überleben (MAZZINGHI et al. 2008).

CXCR7 kann auf einigen Tumorzelllinien (BURNS et al. 2006; MIAO et al. 2007) und primären humanen Tumoren (GOLDMANN et al. 2008; MEIJER et al. 2008; WANG et al.

2008a; IWAKIRI et al. 2009; YOSHIDA et al 2009; SALMAGGI et al 2009) nachgewiesen werden. Dabei korreliert das Tumorwachstum und die Malignität häufig mit dem Expressionslevel des CXCR7-Rezeptors (MIAO et al. 2007; WANG et al. 2008a). Je höher beispielsweise die CXCR7- Expression in Prostatakarzinomen, desto höher sind die adhäsiven und invasiven Eigenschaften sowie die Überlebensrate der Tumorzellen (WANG et al. 2008a).

CXCR7 wird vermehrt in Tumor assoziierten Blutgefäßen exprimiert (MIAO et al. 2007) und reguliert außerdem die Bildung proangiogenetischer Faktoren wie IL-8 oder VEGF, welche zur Tumorangiogenese beitragen (WANG et al. 2008a). Überdies begünstigt CXCR7 das Wachstum von Mamma- und Lungentumoren (MIAO et al. 2007).

Chemotaxisassays zeigen *in vitro*, dass CXCR7 zwar auf die Chemotaxis von Tumorzellen keinen maßgeblichen Einfluss hat, jedoch eine wichtige Rolle bei der SDF-1/CXCR4 vermittelten transendothelialen Migration von CXCR4⁺ und CXCR7⁺ Tumorzellen spielt (ZABEL et al. 2009).

Die Messung der Genexpression verschiedener Chemokinrezeptoren in Lungentumoren nach vollständiger Resektion ergibt einen signifikant erhöhten CXCR7- beziehungsweise CXCR4-Level bei Patienten mit postoperativen metastatischen Rezidiven als bei Patienten ohne Rezidiv. Das sogenannte DFS (disease free survival) fällt bei Patienten mit einer höheren CXCR7-Expression signifikant kürzer aus (IWAKIRI et al. 2009).

Migration von T-Lymphozyten:

Wie in Kapitel 2.8.3.2 beschrieben wird CXCR7 auf vielen Zell- und Gewebstypen exprimiert. In einer initialen Studie fanden Balabanian et al. (2005) heraus, dass CXCR7 eine SDF-1 induzierte Chemotaxis vermitteln kann und die Blockade der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 zu einem additiv inhibitorischen Effekt bezüglich der Migration von T-Lymphozyten führt. Infantino et al. (2006) untersuchten die Expression des CXCR7-Levels in Leukozyten auf RNA- und Proteinebene. CXCR7 wird auf Monozyten und B-Zellen stark exprimiert. Sowohl das Überleben, als auch die erfolgreiche Differenzierung von B-Zellen in Antikörperproduzierende Zellen korrelieren mit dem CXCR7 Expressionslevel auf der Plasmamembran.

Entwicklung des kardiovaskulären Systems:

Sowohl das Ausschalten des sdf-1 Gens, als auch des cxcr4 Gens führt zu ähnlichen Defekten in Knockout Mäusen (MA et al. 1996; NAGASAWA et al. 1996; ZOU et al. 1998). Auch CXCR7^{-/-} Mäuse bilden letale Missbildungen des Herzens aus, bei denen es sich um

Ventrikel-Septum- beziehungsweise Atrium-Septum-Defekte sowie Missbildungen der Semilunarklappen handelt. Die Klappenmissbildungen sind auf eine verminderte Expression von proangiogenetischen Wachstumsfaktoren in Bereichen der neonatalen Klappenentwicklung zurückzuführen (SIERRO et al. 2007). Genauere Untersuchungen des Herzens ergeben kalzifizierte oder verdickte Klappen sowie eine "reitende" Aorta (SIERRO et al. 2007).

In Kontrollwildtypmäusen (C57Bl/6J) ohne Defekte kann eine CXCR7 Expression im Mesenchym und in Gefäßen der entsprechend betroffenen Regionen der Knockouttiere festgestellt werden, was die wichtige Rolle von CXCR7 bei der Herzentwicklung unterstreicht (SIERRO et al. 2007). Humane fetale Herzen zeigen ein ähnliches CXCR7 Expressionsmuster wie murine Herzen (THELEN und THELEN 2008). In einer parallel publizierten Studie wurde nachgewiesen, dass 70% der *Cxcr7*^{-/-} Mäuse innerhalb einer Woche *post natum* versterben. Bei 25% dieser Tiere ergeben pathologische Befunde hyperplastische Herzen. Außerdem weisen 50% der CXCR7^{-/-} Mäuse ein degeneriertes Myokard mit fibrotischen Bereichen auf (GERRITS et al. 2008).

Im Gegensatz zu CXCR4 und SDF-1 defizienten Mäusen kommt es allerdings bei CXCR7-Knockout Tieren zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der Hämatopoese (SIERRO et al. 2007).

Regeneration von Nierengewebe:

An einem experimentell induzierten akuten Niereninfarktmodell in Mäusen wurde gezeigt, dass nekrotische Infarktareale eine deutlich erhöhte SDF-1 Konzentration aufweisen und die Rezeptoren CXCR7 und CXCR4 an der Rekrutierung intravenös applizierter CXCR7⁺ und CXCR4⁺ renaler Progenitorzellen in nekrotische Infarktareale beteiligt sind. Die Blockade des CXCR7 Rezeptors lässt die Überlebensrate der renalen Progenitorzellen sinken und führt zu einer schlechteren Regeneration des Nierengewebes und zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion. Aus *in vitro* Assays geht hervor, dass CXCR7 für die Adhäsion renaler Progenitorzellen an Endothelzellen eine Rolle spielt, während der CXCR4 Rezeptor hauptsächlich die Chemotaxis der Progenitorzellen steuert. Beide Rezeptoren sind somit bedeutsam für die transendotheliale Migration renaler Progenitorzellen (MAZZINGHI et al. 2008).

Regeneration von Nervengewebe:

Bei der Suche nach Therapiemöglichkeiten, die neuronale Regeneration nach Hirninfarkten zu unterstützen, wurde unter anderem bekannt, dass SDF-1 in ischämischen Infarktarealen vermehrt exprimiert wird und CXCR4⁺ inflammatorische Zellen, Stammzellen aus dem Knochenmark sowie neuronale Vorläuferzellen in das geschädigte Gewebe rekrutiert (STUMM et al. 2002; HILL et al. 2004; IMITOLA et al. 2004; OHAB et al. 2006; ROBIN et al. 2006; THORED et al. 2006; WANG et al. 2008b). SDF-1 beziehungsweise CXCR4 Knockout Mäuse weisen ähnliche Störungen in der Entwicklung des Gehirns auf (NAGASAWA et al. 1996; MA et al. 1998; ZOU et al. 1998). Die SDF-1/CXCR4-Achse beteiligt sich somit sowohl an der Neurogenese als auch an Enzephalitiden (STUMM und HÖLLT 2007). Während SDF-1 von endothelialen und neuronalen Zellen in allen Bereichen des physiologischen, adulten Rattengehirns konstitutiv exprimiert wird (THAM et al. 2001; STUMM et al. 2002; BANISADR et al. 2003), ist die Verteilung von CXCR4 regional auf wenige neurogene Hirnbereiche und auf sogenannte Bergmann Glia begrenzt (BANISADR et al. 2002; STUMM et al. 2002; TISSIR et al. 2004; TRAN et al. 2007). Aufgrund der ungleichen Verteilung von SDF-1 und CXCR4 stellen Schöne meier et al. (2008) die Hypothese auf, dass ein weiterer Rezeptor am SDF-1 Signaling im Gehirn beteiligt sein muss. Untersuchungen mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung an einem Hirninfarktmodell an Ratten ergaben, dass CXCR7, im Gegensatz zur regionalen Verteilung von CXCR4, in neuronalen, astroglialen und vaskulären Zellen des Vorderhirns konstitutiv exprimiert wird. Nach Induktion eines Hirninfarktes kann zwar ein hohes SDF-1- und CXCR4-mRNA Expressionsmuster in infarzierten Hirnarealen gemessen werden, eine erhöhte CXCR7-Expression bleibt allerdings im Infarktareal aus und kommt nur im Cortex außerhalb der primären Läsionen vor. Eine marginale CXCR7 Expression weisen lediglich die Blutgefäße innerhalb des infarzierten Bereichs auf (SCHÖNEMEIER et al. 2008), was darauf hindeuten könnte, dass CXCR7 neben SDF-1/CXCR4 (PETIT et al. 2007) bei der Neubildung von Gefäßen in ischämischem Gewebe eine Rolle spielt (SCHÖNEMEIER et al. 2008). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Migration von Zellen, wie beispielsweise CXCR4⁺ Stammzellen (KUCIA et al. 2006), in das Infarktareal über SDF-1 erfolgt und sich die SDF-1/CXCR4-Achse somit an der Regeneration des Nervengewebes post Infarkt beteiligt (SCHÖNEMEIER et al. 2008). Aufgrund seiner Eigenschaft, das Zellüberleben und Zellwachstum zu sichern (BURNS et al. 2006; WANG et al. 2008a), ist dagegen CXCR7 via SDF-1 für den Schutz neuronaler und nicht-neuronaler Zellen vor einem ischämischen Schaden verantwortlich (SCHÖNEMEIER et al. 2008).

Entwicklung der Organanlage des Zebrafisches:

Untersuchungen im Zebrafisch (*Danio rerio*) liefern Beweise für die physiologische Rolle des CXCR7/CXCR4/SDF-1 Trios bei der Entwicklung der Organanlage, genauer gesagt bei der Migration der PMGCs (primordial germ cells, Urkeimzellen). Die Steuerung der Migration erfolgt über das Chemokin SDF-1, welches CXCR4-Rezeptoren auf der Oberfläche der PMGCs aktiviert. CXCR7 schafft mit seiner Eigenschaft als Scavengerrezeptor einen SDF-1-Konzentrationsgradienten, wodurch migrierenden PMGCs eine Wanderungsrichtung vorgegeben wird. CXCR4 wird vornehmlich auf den „front/leading cells“ der Organanlage exprimiert, während CXCR7 überwiegend auf den „trailing cells“ vorkommt (DOITSIDOU et al. 2002; DAMBLY-CHAUDIÈRE et al. 2007; PERLIN und TALBOT 2007; VALENTIN et al. 2007; BOLDAJIPOUR et al. 2008; MAHABALESHWAR et al. 2008).

Expression unter Hypoxie:

Einige Arbeiten legen dar, dass es in hypoxischem Gewebe zu einer verstärkten Expression des CXCR7-Rezeptors beziehungsweise zu einer Hochregulation dessen mRNA kommt (BOSCO et al. 2006). Ein geringer Sauerstoffbedarf in der Umgebung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen und Melanomzellen erhöht die Expression der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf den Tumorzellen und auf dem Endothel (SCHUTYSER et al. 2007). Außerdem wird bei Patienten mit alveolärer Hypoxie eine verstärkte CXCR7-Expression in der Lunge nachgewiesen (COSTELLO et al. 2008).

Um- und Abbau von Knochengewebe:

Wie bereits erwähnt, wird CXCR7 auch von Osteozyten des Knochens sowie in Chondrozyten der Gelenke gebildet. Die Stimulation von CXCR7 führt unter anderem zu einer verstärkten Aktivität von Matrixmetalloproteinasen, die den Matrixabbau herbeiführen. CXCR7 könnte daher an der Entstehung der Osteoarthritis sowie physiologischerweise an der enchondralen Ossifikation beteiligt sein (JONES et al. 2006).

2.8.3.5 Die Signaltransduktionswege der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7

Wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben, erfolgt die Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren über die Kopplung an intrazellulär gelegene G-Proteine.

Die Bindung des endogenen Chemokinliganden SDF-1 an CXCR4 führt zur Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors. Daraufhin werden intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt, die zunächst eine Kopplung an G-Proteine voraussetzen und nachfolgend mit der Aktivierung von Enzymen wie der PKC ζ (Proteinkinase C, zeta), der PTK2 (Proteintyrosinkinase 2), den MAP-Kinasen (mitogen activated protein kinase), ERKs (extracellular-signal-regulated kinases), der JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) und der Aktivierung von NF- κ B Transduktionswegen einhergehen (CRUMP et al. 1997; VILA-CORO et al. 1999; GUPTA et al. 2001; KUCIA et al. 2004; PETIT et al. 2005).

Obwohl CXCR7 eine hohe Affinität zu SDF-1 und ITAC aufweist, und hauptsächlich daher zur Gruppe der Chemokinrezeptoren gezählt wird, stimmen die Eigenschaften dieses Rezeptors nicht mit den üblichen eines klassischen Chemokinrezeptors überein. So kann infolge einer Ligandenbindung die Kopplung an G-Proteine, eine der Eigenschaften, die üblicherweise *per definitionem* zu den Hauptmerkmalen eines Chemokinrezeptors gehören, und ein charakteristisches Chemokin- „Signaling“ für CXCR7 nicht nachgewiesen werden (THELEN 2001; BURNS et al. 2006). Eine Rezeptor-vermittelte Calciummobilisierung oder eine Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden sind für CXCR7 nicht beschrieben (BALABANIAN et al. 2005; BURNS et al. 2006; INFANTINO et al. 2006a; DAMBLY-CHAUDIÈRE et al. 2007; BOLDAJIPOUR et al. 2008; MAZZINGHI et al. 2008).

Die Induktion CXCR7-vermittelter Effekte wie Zelladhäsion, Zellüberleben oder Chemotaxis (BURNS et al. 2006; MIAO et al. 2007) wird auf alternative Signaltransduktionswege zurückgeführt: CXCR7 soll zum einen indirekt über die Bildung von funktionalen Heterodimeren mit CXCR4 die SDF-1 induzierten G-Protein-gekoppelten Signalwege beeinflussen, wobei CXCR7 per se keinen Einfluss auf diese Signalwege hat (SIERRO et al. 2007; LEVOYE et al. 2009). Levoye et al. (2009) und Hartmann et al. (2008) bestätigen, dass CXCR7 für die SDF-1-getriggerte, CXCR4-abhängige Integrinaktivierung verantwortlich ist. Zum anderen soll CXCR7 in der Lage sein über die Interaktion mit multifunktionalen Signal-Adapterproteinen, sogenannten β -Arrestinen (LEFKOWITZ und SHENOY 2005), MAP-Kinasen (mitogen activated protein kinase) zu aktivieren (RAJAGOPAL et al. 2010). Des Weiteren ist beschrieben, dass der CXCR7-Level durch CXCR4 reguliert wird, was anhand tumorös entarteter Prostatazellen mit niedriger CXCR7-Expression bei gleichzeitiger CXCR4 Überexpression gezeigt werden konnte (WANG et al. 2008a).

Viele Chemokinrezeptoren tragen in der Proteinsequenz des N-terminalen Endes der zweiten intrazellulären Schleife das sogenannte „DRYLAIV-Motif“ (Asp-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ile-Val), von dem angenommen wird, dass es für die Kopplung an G-Proteine erforderlich sei. CXCR7 zeigt hinsichtlich dieser Abfolge an zwei Stellen eine Änderung („DRYLSIT“) (HARALDSEN und ROT 2006). Abweichungen von dieser Struktur kommen allerdings auch bei anderen Chemokinrezeptoren wie zum Beispiel XCR1 und CXCR6 vor. Für diese Rezeptoren existiert nachweislich ein Signaling über Pertussis Toxin sensitive G-Proteine (YOSHIDA et al. 1998; CHANDRASEKAR et al. 2004). Pertussis Toxin ist ein Inhibitor von G-Proteinen. Für CXCR7 sind bislang Vorgänge beschrieben, die eine Kopplung an G-Proteine durchaus voraussetzen (THELEN 2001; BALABANIAN et al. 2005; BOLDAJIPOUR et al. 2008). Nicht vernachlässigt werden sollte die Tatsache, dass die dritte intrazelluläre Schleife, deren Struktur unter Chemokinrezeptoren weniger konserviert ist, ebenfalls eine wichtige Rolle spielt bei der Interaktion von Chemokinrezeptoren mit G-Proteinen. Demnach ist ein G-Protein-gekoppeltes Signaling über CXCR7 nicht vollständig auszuschließen (THELEN und THELEN 2008).

In der Literatur wird angenommen, dass CXCR7, wie bereits erwähnt, nicht als klassischer Chemokinrezeptor, sondern vielmehr als „Lock- oder Transporterrezeptor“ beziehungsweise als Scavengerrezeptor ("Fängerrezeptor") für SDF-1 fungiert und somit die für CXCR4 verfügbare Menge an SDF-1 limitiert (BURNS et al. 2006; DAMBLY-CHAUDIÈRE et al. 2007; HARTMANN et al. 2008). Um einer überschießenden Inflammation oder reperfusionsbedingten Gewebsschäden (z.B. Reperfusion nach Myokardinfarkt), entgegenzuwirken, muss die Expression an Chemokinen limitiert sein. Überschüssige Chemokine können über "decoy-receptors" ("interceptors") aus dem Organismus entfernt werden (NIBBS et al. 2003; COMERFORD et al. 2006). Dabei werden Chemokine durch den "Fängerrezeptor" gebunden und internalisiert, ohne eine zelluläre Antwort zu induzieren (LOCATI et al. 2005; HARALDSEN und ROT 2006; BOLDAJIPOUR et al. 2008).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielsetzung

Verletzungen des Endothels, wie sie beispielsweise nach Plaque-Ruptur im Rahmen artherosklerotischer Prozesse, nach Stentimplantation oder Ballondilatation auftreten, führen zur Freilegung subendothelial gelegener Matrixproteine. Dies führt neben der Aktivierung von Thrombozyten zu einer verstärkten Einwanderung von Leukozyten wie zum Beispiel Monozyten und zur Rekrutierung von Stammzellen aus der Peripherie.

Bei der Reendothelialisierung können eine verstärkte Adhäsion von Stammzellen an Gefäßdefekte, die zur Endothelialisierung beitragen, beziehungsweise eine Hemmung überschießender inflammatorischer und thrombogener Vorgänge, wie sie durch Thrombozyten und Monozyten verursacht werden, hilfreich sein. Das Chemokin SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), welches bei einem Gewebeschaden freigesetzt wird, beeinflusst die Adhäsion von Blutzellen an die Gefäßwand. Bekannte Chemokinrezeptoren von SDF-1 sind sowohl CXCR4 als auch CXCR7. Welche Funktion der Chemokinrezeptorligand CXCR7 bei der Adhäsion einnimmt, ist bislang nicht untersucht.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der differenziellen Rolle der Chemokinrezeptoren CXCR7 und CXCR4 für die Adhäsion humaner Monozyten, Thrombozyten und CD34⁺ Stammzellen an Gefäßwanddefekte *in vivo*. Die Ziele dieser Arbeit lauten wie folgt:

1. Beeinflussung der Adhäsion humaner Monozyten durch Blockade des CXCR7-Rezeptors (im Vergleich zu einer CXCR4- Rezeptor- Blockade).
2. Beeinflussung der Adhäsion humaner Thrombozyten durch Blockade des CXCR7-Rezeptors (im Vergleich zu einer CXCR4- Rezeptor- Blockade).
3. Beeinflussung der Adhäsion humaner Stammzellen durch Blockade des CXCR7-Rezeptors (im Vergleich zu einer CXCR4- Rezeptor- Blockade).

Zur Untersuchung dienen zwei Mausmodelle an C57BL/6J Mäusen. Beim ersten Modell handelt es sich um ein ligaturinduziertes Verletzungsmodell der Arteria carotis communis. Diesem steht ein Ischämie-Reperusionsmodell am Dünndarm gegenüber. An beiden Modellen werden die Interaktionen genannter Zellen mit der Gefäßwand mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie optisch dargestellt.

3.2 Untersuchungsgut und Methoden

3.2.1 Übersicht über den Ablauf der Versuche

Es stehen zwei Verletzungsmodelle an Mäusen zur Verfügung, an denen die Interaktion der zu verabreichenden Zellen mit dem geschädigten Gefäßendothel, untersucht wird. Bei dem ersten Modell, welches für Gefäßverletzungen in der Makrozirkulation steht, wie beispielsweise Endothelverletzungen nach Plaqueruptur bei Atherosklerose, nach Ballondilatation oder nach Stentimplantation, handelt es sich um ein ligaturinduziertes Verletzungsmodell der Arteria carotis communis. Dabei wird durch eine fünf Minuten andauernde Ligatur der Arteria carotis communis dextra beziehungsweise sinistra eine Verletzung des Endothels erzielt. Das andere Modell, ein Ischämie-Reperusionsmodell am Dünndarm, steht für ischämische Vorgänge und Reperusionssschäden in der Mikrozirkulation, beispielsweise bei Ischämie nach Myokardinfarkt. Hierbei wird durch eine einstündige Verhinderung der Blutzufuhr eine Ischämie des betroffenen Darmabschnitts verursacht. Die Reperusion tritt ein, sobald die Ligaturen nach einer Stunde gelöst werden. Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie werden an beiden Modellen die Interaktionen der verabreichten, fluoreszenzgefärbten Zellen mit der Gefäßwand, vor und nach ligaturinduzierter Verletzung beziehungsweise Ischämie-Reperusionsbedingtem Schaden, optisch dargestellt. Die Aufnahmen werden aufgezeichnet und später ausgewertet.

Für die Versuche werden drei Zelltypen herangezogen: Humane Monozyten, humane Thrombozyten und humane CD34⁺ Stammzellen. Nach der Isolierung werden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, Fa. Molecular Probes, USA) gefärbt, wodurch sie für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie sichtbar sind. Außerdem erfolgt eine Vorinkubation der Zellen mit einem blockierenden Antikörper beziehungsweise der entsprechenden Isotypkontrolle für dreißig Minuten.

Nachfolgend werden die einzelnen Versuchsgruppen für das ligaturinduzierte Verletzungsmodell an der Arteria carotis communis dexter und sinister in *Tab. 1* und für das Ischämie-Reperusionsmodell am Dünndarm in *Tab. 2* dargestellt.

Zelltyp (Zellzahl/ μ l/Maus)	Antikörper	<i>Carotis</i> (<i>n</i>)	Antikörper	<i>Carotis</i> (<i>n</i>)	Antikörper	<i>Carotis</i> (<i>n</i>)
	IgG-Kontrolle		IgG-Kontrolle		IgG-Kontrolle	
Monozyten ($5 \times 10^4/250\mu$ l)	aCXCR7 (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	aCXCR4 (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	aCXCR4+7 (à 10 μ g/ml)	-----
	IgG₁ (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	IgG_{2B} (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 10	IgG_{2B}+IgG₁ (à 10 μ g/ml)	-----
Thrombozyten ($5 \times 10^6/250\mu$ l)	aCXCR7 (20 μ g/ml)	<i>n</i> = 8	aCXCR4 (20 μ g/ml)	<i>n</i> = 10	aCXCR4+7 (à 20 μ g/ml)	-----
	IgG₁ (20 μ g/ml)	<i>n</i> = 8	IgG_{2B} (20 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	IgG_{2B}+IgG₁ (à 20 μ g/ml)	-----
CD34⁺ Zellen ($5 \times 10^4/250\mu$ l)	aCXCR7 (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 8	aCXCR4 (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	aCXCR4+7 (à 10 μ g/ml)	<i>n</i> = 6
	IgG₁ (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 8	IgG_{2B} (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	IgG_{2B}+IgG₁ (à 10 μ g/ml)	<i>n</i> = 6

Tab. 1: Versuchsgruppen für das ligaturinduzierte Verletzungsmodell an der Arteria carotis communis.

Zelltyp (Zellzahl/ μ l/Maus)	Antikörper	<i>Mesenterial- gefäße</i> (<i>n</i>)	Antikörper	<i>Mesenterial- gefäße</i> (<i>n</i>)	Antikörper	<i>Mesenterial- gefäße</i> (<i>n</i>)
	IgG-Kontrolle		IgG-Kontrolle		IgG-Kontrolle	
Monozyten ($5 \times 10^4/250\mu$ l)	aCXCR7 (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	aCXCR4 (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 5	aCXCR4+7 (à 10 μ g/ml)	-----
	IgG₁ (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	IgG_{2B} (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 5	IgG_{2B}+IgG₁ (à 10 μ g/ml)	-----
Thrombozyten ($5 \times 10^6/250\mu$ l)	aCXCR7 (20 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	aCXCR4 (20 μ g/ml)	<i>n</i> = 5	aCXCR4+7 (à 20 μ g/ml)	-----
	IgG₁ (20 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	IgG_{2B} (20 μ g/ml)	<i>n</i> = 5	IgG_{2B}+IgG₁ (à 20 μ g/ml)	-----
CD34⁺ Zellen ($5 \times 10^4/250\mu$ l)	aCXCR7 (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	aCXCR4 (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 7	aCXCR4+7 (à 10 μ g/ml)	-----
	IgG₁ (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 6	IgG_{2B} (10 μ g/ml)	<i>n</i> = 7	IgG_{2B}+IgG₁ (à 10 μ g/ml)	-----

Tab. 2: Versuchsgruppen für das Ischämie-Reperusionsmodell am Dünndarm.

Pro Versuch werden zwei Mäuse eingesetzt. Der ersten Maus werden Zellen (humane Monozyten oder Thrombozyten oder CD34⁺ Zellen), die mit anti-CXCR7 oder anti-CXCR4 vorinkubiert sind, intravenös appliziert. Die Kontrollmaus erhält die mit der dazugehörigen Isotypkontrolle (IgG₁ oder IgG_{2B}) vorinkubierten Zellen. Das applizierte Volumen pro Maus beträgt stets 250 µl. Darin sind im Falle der Monozyten und CD34⁺ Zellen 5x10⁴ und im Falle der Thrombozyten 5x10⁶ Zellen gelöst. Es sei angemerkt, dass die Zellzahl in den Gruppen mit Thrombozyten aufgrund der geringen Zellgröße erhöht werden muss. Die eingesetzte Antikörperkonzentration ist entsprechend verdoppelt.

3.2.2 Isolierung, Färbung und Vorinkubation der verwendeten Zellen

3.2.2.1 Isolierung von humanen Monozyten

Die Monozytenisolation wird nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Mit CPDA (Citate Phosphate Dextrose Adenine) versetztes humanes Vollblut (circa 60 ml) wird mit 50 ml PBS (Phosphat Buffered Saline) verdünnt und auf eine Schicht aus Ficoll-Paque (Ficoll-PaqueTM PLUS, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) überführt, sodass zwei Phasen entstehen. Es folgt ein Zentrifugationsschritt (900 g, 17 Minuten, RT = Raumtemperatur), bei dem sich drei Phasen bilden. Eine obere Schicht aus Plasma, eine Intermediärschicht mit Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten und eine untere Schicht aus roten Blutbestandteilen. Die Intermediärschicht wird abpipettiert und mit PBS verdünnt. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (500 g, 10 Minuten, RT), bei dem ein Zell-Pellet mit Überstand entsteht. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, erneut mit PBS verdünnt und einer weiteren Zentrifugation (500 g, 10 Minuten, RT) unterzogen. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4 ml Monozytenmedium (VLE RPMI 1640 Medium, Biochrom AG, Berlin, Deutschland + Fetales Kälberserum 10% + Penicillin/Streptomycin 1%) resuspendiert. Die Zellsuspension wird in eine Zellkulturschale überführt, mit Monozytenmedium (4 ml) versetzt und über Nacht im Brutschrank aufbewahrt, sodass die Monozyten adhärieren können.

Am nächsten Tag wird die Zellkulturschale mit PBS gewaschen, um nicht adhärente Zellen abzuspielen. Anschließend werden die adhärenen Monozyten von der Zellkulturschale abtrypsinisiert (4-5 ml Trypsin). Die Zellsuspension wird mit Monozytenmedium (15-20 ml) versetzt und einem letzten Zentrifugationsschritt (500 g, 10 Minuten, RT) unterzogen. Das entstandene Pellet wird in PBS resuspendiert. Anschließend wird die Zellzahl in der

Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wird eine Verdünnung aus 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau hergestellt.

Nun kann die für den Versuch benötigte Menge an Monozyten entnommen werden.

3.2.2.2 Isolierung von humanen Thrombozyten

Die Thrombozytenisolation wird nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Mit 4 ml ACD-Puffer (Acid-Citrate-Dextrose Puffer) versetzes humanes Vollblut (circa 20 ml) wird zunächst zentrifugiert (200 g, 20 Minuten, RT). Daraufhin wird das plättchenreiche Plasma (PRP) abpipettiert und mit Tyrodes Puffer (pH = 6,5; 0,1% BSA (Bovines Serum Albumin)/Glucose) verdünnt. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (900 g, 10 Minuten, RT). Nach Verwerfen des Überstandes wird das entstandene Zellpellet in 200-500 µl Tyrodes-Puffer (pH = 6,5; 0,1% BSA/Glucose) resuspendiert. Für die nachfolgende Zellzahlbestimmung in einem automatischen Hämatologie-Analysator (KX-21N, Sysmex Corporation, Kobe Japan) wird eine Verdünnung aus 20 µl Zelllösung und 180 µl PBS hergestellt. Zuletzt erfolgt eine Neutralisierung der Zellsuspension mit 500 µl Tyrodes-Puffer (pH = 7,4; 0,1% BSA/ Glucose).

Nun kann die für den Versuch benötigte Menge an Thrombozyten entnommen werden.

3.2.2.3 Isolierung von humanen CD34⁺ Zellen

Grundsätzlich können hämatopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut (DAUB et al. 2006), aus dem Knochenmark oder aus peripherem Blut isoliert werden. Es besteht die Möglichkeit, die Hämatopoese der Stammzellen auf medikamentösem Wege anzuregen und somit die Anzahl der im Blut zirkulierender Stammzellen zu erhöhen, beispielsweise mit dem Cytokin G-CSF.

In dieser Arbeit werden die Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut isoliert.

Es wird die sogenannte MACS-Technik (magnetic affinity cell sorting) angewendet, wobei das CliniMACS[®] System als Standardverfahren gilt. Mit diesem System können Zellen voneinander separiert werden. Die Technik beruht darauf, dass mit Magnetpartikeln gekoppelte Antikörper, die gegen den Stammzellmarker CD34 gerichtet sind, spezifisch an das CD34 Antigen binden. In einem Magnetfeld erfolgt die Trennung der CD34⁺ Zellen von den restlichen Zelltypen. Es folgen mehrere hintereinander geschaltete Isolierungs- und

Waschschritte, wodurch eine sehr hohe Reinheit der CD34⁺ Zellen erreicht wird. Bis zum Gebrauch werden die Zellen in Medium (mit humanem Albumin und Dimethylsulfoxid) portionsweise (1×10^6 Zellen) bei -80°C gelagert.

Am jeweiligen Versuchstag werden die Stammzellen in IMD-Medium (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium) aufgetaut. Anschließend wird die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wird eine Verdünnung aus 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau hergestellt.

Nun kann die für den Versuch benötigte Menge an Stammzellen entnommen werden.

3.2.2.4 DCF-Färbung von humanen Monozyten

Nach der Isolierung aus Vollblut werden die Monozyten (2×10^5 /ml) mit 180 µl des Fluoreszenzfarbstoffes DCF (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, Fa. Molecular Probes, USA; $c = 2,5\text{mg/ml}$) versetzt und damit für zehn bis fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Somit sind die Monozyten für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie sichtbar.

Anschließend werden die Zellen mit 14 ml sterilem PBS (Phosphat Buffered Saline) gewaschen und es folgt ein Zentrifugationsschritt (270 g, 10 Minuten, RT). Das entstandene Pellet wird in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und je 500 µl in ein steriles Gefäß überführt. Die Zellsuspension ist nun für die intravenöse Gabe vorbereitet.

3.2.2.5 DCF-Färbung von humanen Thrombozyten

Nach der Isolierung aus Vollblut werden die Thrombozyten (20×10^6 /ml) mit 100 µl des Fluoreszenzfarbstoffes DCF ($c = 2,5\text{mg/ml}$) versetzt und damit für fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Somit sind die Thrombozyten für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie sichtbar.

Anschließend werden 300 µl Tyrodes-Puffer (pH = 7,4; 0,1% BSA (Bovines Serum Albumin)/Glucose) dazugegeben. Es folgt eine Zentrifugation (900 g, 10 Minuten, RT). Das entstandene Pellet wird in 600 µl Tyrodes-Puffer (300 µl Tyrodes pH = 6,5; 0,1% BSA/Glucose, 300µl Tyrodes pH = 7,4; 0,1% BSA/Glucose) resuspendiert und in ein steriles Gefäß überführt. Die Zellsuspension ist nun für die intravenöse Gabe vorbereitet.

3.2.2.6 DCF-Färbung von humanen CD34⁺ Zellen

Nach dem Auftauen der Stammzellen und der Bestimmung der Zellzahl, werden die Stammzellen ($2 \times 10^5/\text{ml}$) bei 270 g für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das entstandene Zellpellet in 1 ml sterilem PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wird daraufhin mit 180 μl des Fluoreszenzfarbstoffes DCF ($c = 2,5\text{mg/ml}$) versetzt und damit für zehn Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Somit sind die CD34⁺ Zellen für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie sichtbar.

Anschließend werden die Zellen mit 14 ml PBS gewaschen und es folgt ein Zentrifugationsschritt (270 g, 10 Minuten, RT). Nach Verwerfen des Überstandes wird das entstandene Pellet in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und je 500 μl in ein steriles Gefäß überführt. Die Zellsuspension ist nun für die intravenöse Gabe vorbereitet.

3.2.2.7 Vorinkubation der verwendeten Zellen mit blockierenden Antikörpern

Nach der Isolierung und der Fluoreszenzfärbung mit DCF werden die Zellen für dreißig Minuten bei 37°C mit einem blockierenden Antikörper beziehungsweise der entsprechenden Isotypkontrolle vorinkubiert.

Tab. 1 und Tab. 2 (siehe Kap. 3.2.1) geben einen Überblick darüber, welche Zellen und Antikörper in den jeweiligen Versuchsgruppen verwendet werden.

Bei den Antikörpern handelt es sich zum einen um anti-CXCR7 (Monoclonal anti-human CXCR7/RDC-1 Antibody), der spezifisch gegen den humanen CXCR7 Rezeptor gerichtet ist und diesen blockiert. IgG₁ (Mouse IgG₁ Isotype Control) kommt als entsprechende Isotypkontrolle zum Einsatz.

Zum anderen wird der Antikörper anti-CXCR4 (Monoclonal anti-human CXCR4/Fusin Antibody) verwendet, der spezifisch an humane CXCR4 Rezeptoren auf der Zelloberfläche bindet und diese blockiert. Als entsprechende Isotypkontrolle wird IgG_{2B} (Monoclonal mouse IgG_{2B} Isotype Control) eingesetzt.

Im Folgenden sind die Herstellerangaben zu den verwendeten Antikörpern und den entsprechenden Isotypkontrollen aufgeführt:

- Monoclonal anti-human CXCR7/RDC-1 Antibody:
R&D Systems, Cat. # MAB42273 (Clone 11G8)
- Mouse IgG₁ Isotype Control:
R&D Systems, Cat. # MAB002 (Clone 11711)
- Monoclonal anti-human CXCR4/Fusin Antibody:
R&D Systems, Cat. # MAB172 (Clone 44716)
- Monoclonal mouse IgG_{2B} Isotype Control:
R&D Systems, Cat. # MAB0041 (Clone 133303)

3.2.3 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienen männliche, sechs bis acht Wochen alte Wildtypmäuse (C57BL/6J), die auf Bestellung von Charles River Laboratories (Charles River Deutschland GmbH, D-97633 Sulzfeld) im Alter von fünf Wochen geliefert werden.

Die Haltung in Käfigen (Makrolon-Typ II long) erfolgt in Gruppen von bis zu fünf Tieren. Als Einstreu wird entstaubtes, keimfreies Weichholzgranulat aus Espenholz (Fa. ABEDD-LAB & VET Service GmbH, Wien, Österreich) verwendet, welche einmal pro Woche gewechselt wird. Den Tieren wird als Nestbaumaterial und zur Beschäftigung ein Stück sterilisiertes Zellstoffpapier angeboten. Sowohl Futter (Fa. Provimi Kliba, Kaiseraugst, Schweiz) als auch frisches Wasser steht *ad libitum* zur Verfügung.

In der Tierhaltung herrscht eine Raumtemperatur von 21°C und die relative Luftfeuchtigkeit liegt bei 50 bis 60 %. Über eine Entlüftungsanlage wird die verbrauchte Raumluft konstant abgeführt. Um einen geregelten Schlaf-Wach-Rhythmus der Mäuse zu gewährleisten, beträgt die Helligkeitsphase zwölf Stunden bei einer im Käfig erreichten Lichtstärke von 50 Lux.

Alle in dieser Studie durchgeführten Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen gemäß §8 Tierschutzgesetz (Neufassung 18.05.2009) nach Vorlage eines Tierversuchsantrags genehmigt.

3.2.4 Aufbau des Arbeitsplatzes

Zur Durchführung der Versuche benötigt man verschiedene Gerätschaften (*Abb.12*). Am Arbeitsplatz befindet sich das auf einer Wärmematte fixierte Versuchstier mit angeschlossenem Narkoseinhalationsgerät. Des Weiteren benötigt man ein Stereomikroskop mit Kaltlichtquelle (Carl Zeiss AG, Göttingen) und chirurgische Instrumente für die Präparation der Maus. Für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen ist ein Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Fa. Zeiss, Göttingen) aufgebaut mit einer Quelle für das Anregungslicht (HBO 100, Fa. Zeiss, Göttingen) und einer CCD-Kamera (Charged Coupled Device-Kamera, FK 6990-IQ-S, Fa. Pieper GmbH, Schwerte). Die Kamera ist zur Visualisierung und Aufzeichnung der Zell-Endothel-Interaktionen an einen CD-Rekorder (Video Disk Recorder, VDR-3000) mit Bildschirm angeschlossen. Die Aufnahmen stehen dadurch zur späteren Auswertung zur Verfügung.



Abb. 12: Aufbau des Arbeitsplatzes.

3.2.5 Wahl, Durchführung und Überwachung der Narkose

Die Versuchstiere liegen über den gesamten Zeitraum der Eingriffe bis einschließlich zum Zeitpunkt der Opferung in Narkose. Eingesetzt wird eine Injektionsnarkose, die sich aus drei Präparaten zusammensetzt und intraperitoneal appliziert wird: 0,5 mg/kg KGW Medetomidin (Domitor[®], Pfizer GmbH, Karlsruhe), 0,05 mg/kg KGW Fentanyl (Fentanyl 0,5mg curamed[®], CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) und 5,0 mg/kg KGW Midazolam (Midazolam-ratiopharm 5mg/1ml[®], ratiopharm GmbH, Ulm). Diese sichert die chirurgische Toleranz während der Versuchszeit (HENKE und ERHARDT 2004).

Zur Aufrechterhaltung der Narkose, erhalten die Tiere über eine Nasenmaske eine Inhalationsnarkose aus 0,5-1% Isofluran (Isoba[®], ESSEX Pharma GmbH, München) in Sauerstoff (Linde AG, Pullach).

Im Rahmen des Narkose-Monitorings werden sowohl die Puls- und Atemfrequenz beziehungsweise der Atemtyp, als auch die Reflexe in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Durch den Einsatz einer Wärmematte wird eine konstante Körpertemperatur des Tieres von circa 37-38°C gewährleistet.

3.2.6 Vorbereitung der Versuchstiere für die Intravitalmikroskopie

Die anästhesierte Maus wird in Rückenlage auf eine mit einem OP-Tuch bedeckte Wärmematte gelegt und an den Vorder- und Hintergliedmaßen mit Klebeband fixiert. Um ein Austrocknen der Augen zu vermeiden, wird eine Augensalbe (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Fa. Bayer, Leverkusen) verwendet. Zunächst wird der ventrale Halsbereich gründlich enthaart, gereinigt und desinfiziert. Alle nachfolgenden Präparationsschritte werden unter einem Stereomikroskop durchgeführt. Zur Ausleuchtung des OP-Feldes dient eine Kaltlichtquelle.

Als erstes wird vom Kinnwinkel beginnend nach caudal ein ca. 1 cm langer medianer Hautschnitt über den Mandibularisdrüsen ausgeführt. Die beiden Speicheldrüsenhälften werden stumpf voneinander getrennt und wahlweise nach medial und lateral gelagert, um einzelne Gefäße besser darzustellen zu können. Kleine Gefäße werden mit Hilfe eines Elektrokauters verodet, während größere, in die Muskulatur ziehende Gefäße, mit einem Faden (6-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) ligiert werden. Nun wird die Vena jugularis

sinistra vorsichtig freipräpariert. Außerdem wird um die Jugularisvene ein Faden (7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) vorgelegt, der rasch zu einem chirurgischen Knoten zugezogen werden kann, um später den Katheter (Polythene Tubing, 0,28mm ID, 0,61mm OD, Ref. 800/110/100) zügig und möglichst ohne größere Blutverluste zu befestigen. Mittels einer Mikroschere erfolgt eine kleine Inzision der Jugularisvene. Über die entstandene Öffnung wird der Katheter eingeführt und befestigt (*Abb. 13*). Zur Überprüfung der korrekten Lage des Venenkatheters, erfolgt eine Spülung mit isotoner Natriumchloridlösung (Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg).

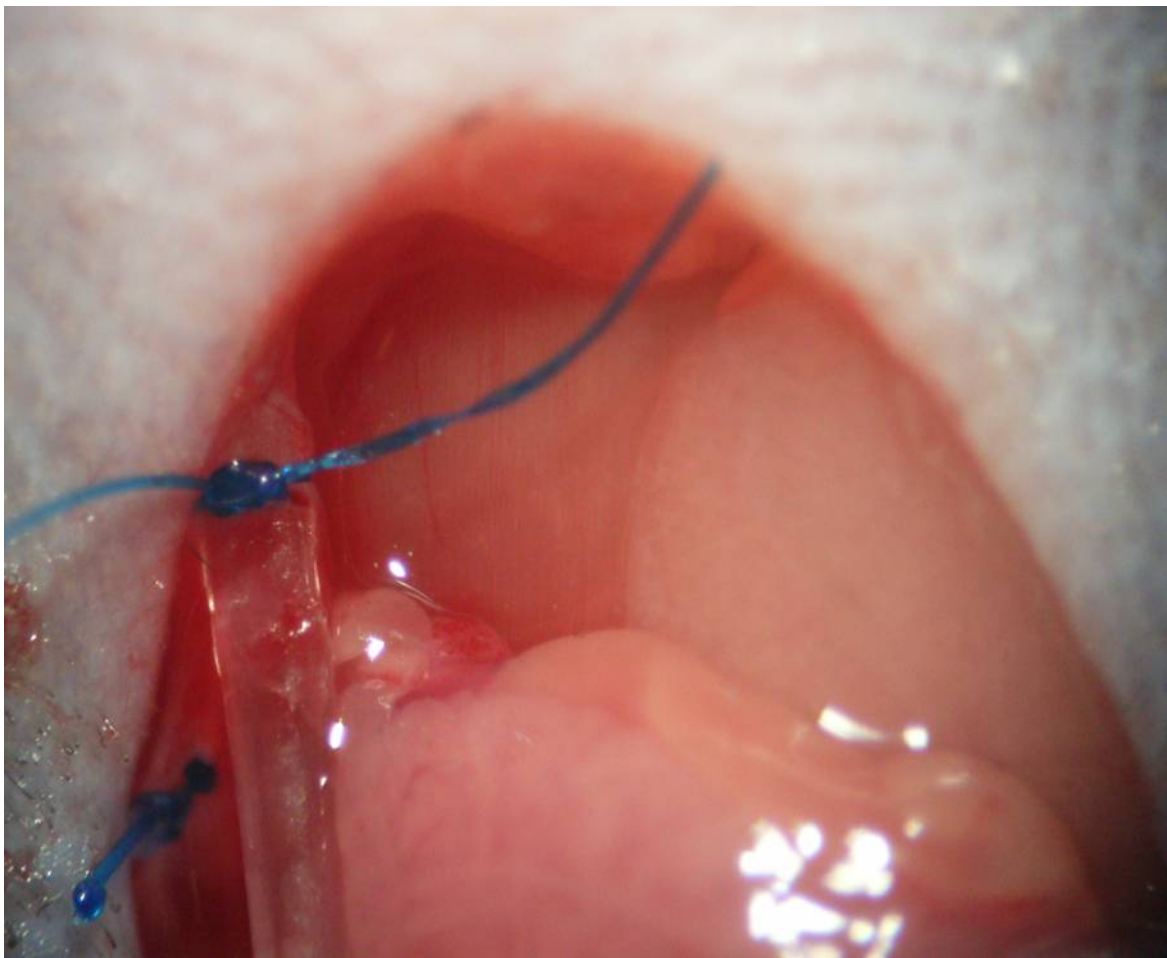


Abb. 13: Lage des Venenkatheters.

3.2.6.1 Vorbereitung für die Aufnahmen an der Arteria carotis

Sobald der Katheter in der korrekten Position liegt, werden die Carotiden aufgesucht und unter Schonung angrenzender Venen und des Nervus vagus vorsichtig freipräpariert. Um bei den späteren Aufnahmen einen höheren Kontrast zu erzielen, werden unter die Arteria carotis communis dexter und sinister jeweils ein circa. 5 mm langes und 2 mm breites, schwarzes und

flexibles Stück Plastikfolie gelegt. Es muss sorgfältig darauf geachtet werden, dass die freigelegten Carotiden stets mit isotoner Natriumchloridlösung feucht gehalten werden, um ein Austrocknen der Gefäße beziehungsweise eine vorzeitige Aktivierung des Endothels und eine ungewollte Thrombenbildung zu vermeiden (*Abb. 14*).

Das fertig vorbereitete Tier wird nun unter das Fluoreszenzmikroskop gelegt. Über den Venenkatheter werden anschließend die fluoreszenz-markierten Zellen appliziert.

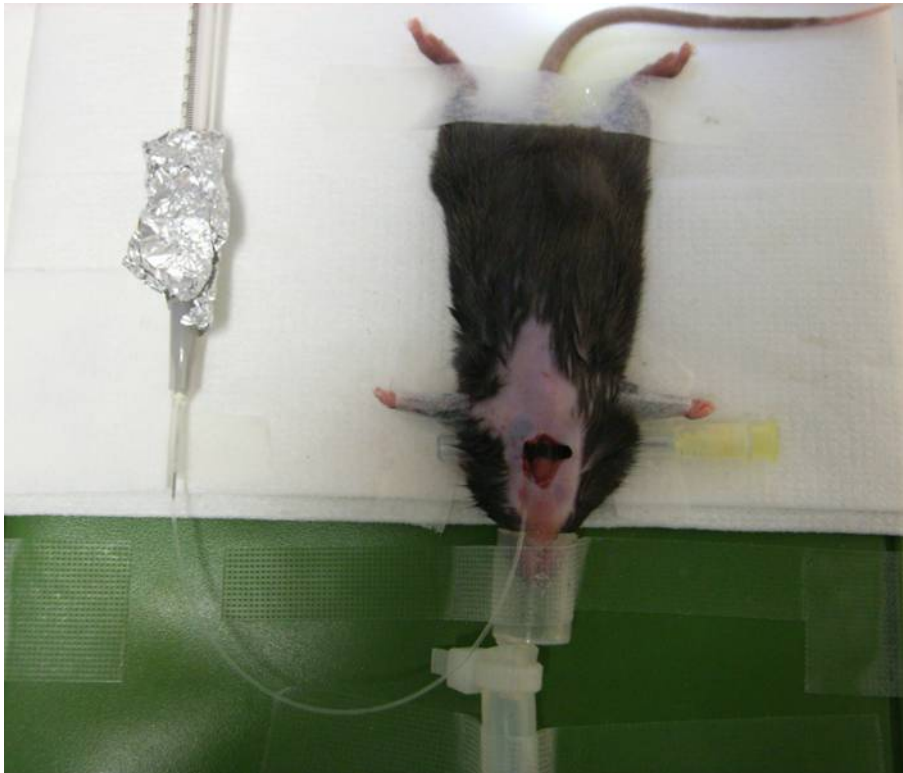


Abb. 14: Vorbereitete Maus für die Aufnahmen an der *A. carotis communis*.

3.2.6.2 Vorbereitung für die Aufnahmen am Dünndarm

Sobald der Katheter in der korrekten Position liegt, wird die Bauchhöhle in der Linea alba eröffnet. Für eine bessere Übersicht ist es hilfreich zunächst die Harnblase manuell zu entleeren. Dann wird der gesamte Dünndarm (Jejunum) auf Parafilm (VWR International GmbH, Bruchsal) ausgelagert (*Abb. 15*). Das Befeuchten mit körperwarmer Ringerinjektionslösung (Fa. B. Braun Deutschland, Melsungen AG) verhindert ein Austrocknen des Darmes. Nun wird ein Darmsegment auf die befeuchtete Rinne eines selbstgebauten Styropor-Knet-Modells gelagert und mit einem Objektträger bedeckt.

Daraufhin wird die Maus unter das Fluoreszenzmikroskop gelegt und es erfolgt die Applikation der fluoreszenzmarkierten Zellen über den Venenkatheter.

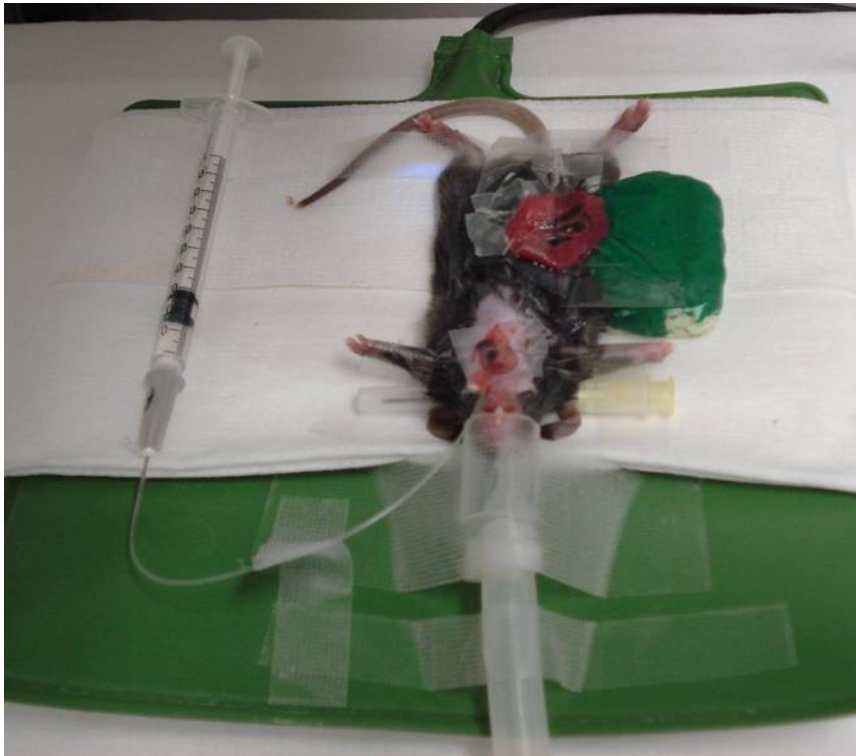


Abb. 15: *Vorbereitete Maus für die Aufnahmen am Dünndarm.*

3.2.7 Methode und Durchführung der Intravitalmikroskopie

Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, fluoreszenzmarkierte Zellen *in vivo* optisch darzustellen. Da das zu beobachtende Objekt nicht durchstrahlt, sondern durch das Objektiv beleuchtet wird, lautet die korrekte Bezeichnung Epifluoreszenzmikroskopie (epi, griech= neben). Erstmals 1904 von August Köhler beobachtet und von der Firma Carl Zeiss durch August Köhler und Henry Siedentopf entwickelt, wurde die Intravitalmikroskopie laut Sumen et al. (2004) zuerst von Rudolf Wagner und Julius Friedrich Cohnheim durchgeführt.

Der physikalische Hintergrund beruht darauf, dass Fluorophore kurzwelliges Anregungslicht absorbieren und als langwelliges Fluoreszenzlicht wieder emittieren. Im selben Strahlengang werden Anregungs- und Emissionslicht durch einen Farbeiler optisch voneinander getrennt. Durch die Verwendung spezieller optischer Filter, kann das Fluoreszenzmikroskop auf spezielle Spektralbereiche (Anregung: 495nm, Emission: 517nm) eingestellt werden.

In der folgenden Arbeit werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, Fa. Molecular Probes, USA) gefärbte humane Monozyten,

Thrombozyten und CD34⁺ Zellen eingesetzt. DCF gelangt per Diffusion durch die intakte Zellmembran.

In der Zelle angelangt, wird der Farbstoff durch intrazelluläre Esterasen gespalten. Dabei entsteht ein Produkt, das eine detektierbare Fluoreszenz erzeugt und eine kovalente Bindung mit intrazellulären Lysinresten und anderen Aminquellen eingeht.

Der ausreichende Kontakt zum Gewebe wird durch ein 20x - Objektiv mit Wasserimmersion hergestellt.

3.2.7.1 Intravitalmikroskopie an der Arteria carotis communis

Die ersten beiden Aufzeichnungen beinhalten eine Übersichtsaufnahme der rechten und linken Arteria carotis communis mit dem 10x - Objektiv des Fluoreszenzmikroskops, um den Gefäßdurchmesser zu bestimmen. Dieser wird für die spätere Berechnung der Anzahl der Zellen pro mm² benötigt.

Darauf folgen mit dem 20x - Objektiv an beiden Carotiden vor ligaturinduzierter Verletzung jeweils vier Aufnahmen (à 30 sec) an vier verschiedenen Stellen des Gefäßes. Es kann damit überprüft werden, ob bereits vor Ligatur ungewollt Zellen an die Gefäßwand binden.



Abb. 16: Freipräparierte Carotiden: (A) vor Ligatur, (B) Setzen der Ligatur, (C) nach Lösen der Ligatur.

Durch das Setzen einer fünf minütigen Ligatur (Faden 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) wird anschließend eine Endothelschädigung herbeigeführt (Abb. 16). Die Aufnahmezeitpunkte nach Lösen der Ligatur liegen an beiden Carotiden bei 5, 10, 30 und 60 Minuten. Es werden auch hier mit 200-facher Vergrößerung jeweils vier Aufnahmen (à 30 sec) pro Zeitfenster angefertigt. Alle Aufnahmen werden an einem Monitor mitverfolgt und von einem angeschlossenen CD-Rekorder zur späteren Auswertung aufgezeichnet.

3.2.7.2 Intravitalmikroskopie am Dünndarm

Die Aufnahmen am Dünndarm laufen in ähnlicher Weise ab wie an der Carotis. Sie werden auch hier in 200-facher Vergrößerung mit Wasserimmersion aufgenommen.

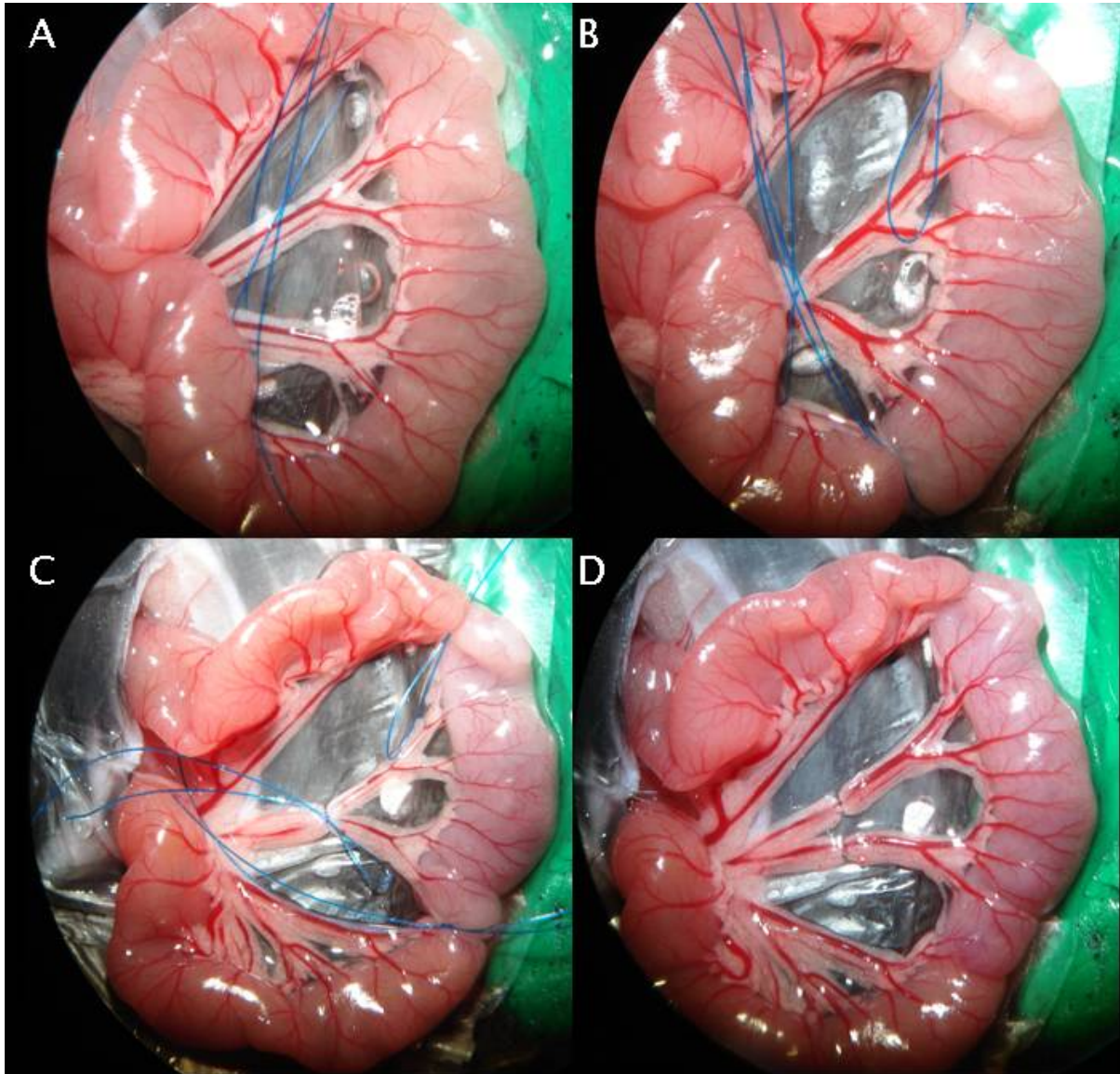


Abb. 17: Freipräparierter Dünndarmabschnitt: (A) vor Ischämie, (B) Setzen der Ligaturen, (C) Ischämiephase, (D) Reperfusionsphase.

Es erfolgen vor ligaturinduzierter Ischämie jeweils vier Aufnahmen (à 30 sec) an Arteriolen und Venolen. Die anschließende Ischämiedauer beträgt eine Stunde. Diese wird durch die Ligatur (Faden 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) des versorgenden Mesenterialgefäßes sowie beider Enden des ausgewählten Darmsegments erreicht (Abb. 17). Während der einstündigen Ischämiephase wird das Jejunum in die Bauchhöhle reponiert, um ein Auskühlen beziehungsweise Austrocknen zu verhindern.

Sobald die Ligaturen nach Ablauf einer Stunde gelöst werden, setzt die Reperfusion ein. Die Aufnahmezeitpunkte nach Reperfusion liegen bei 5, 10, 30, 60 und 90 Minuten. Es erfolgen auch hier an Arteriolen und Venolen jeweils vier Aufnahmen (à 30 sec) pro Zeitfenster.

Um den Kreislauf während des Eingriffs zu stabilisieren, wird das Tier mit Ringerlactatlösung infundiert.

3.2.8 Dokumentation und Auswertung der IVM-Aufnahmen

Für jeden Versuch wird ein eigener Dokumentationsbogen mit vorgefertigten Datenblättern angelegt. Neben Informationen über das Versuchstier wie Tierstamm, Tiernummer, Alter und Geschlecht, wird das Versuchsdatum vermerkt und ein kurzes Versuchsprotokoll verfasst. Darin enthalten sind Art und Menge der verabreichten Zellen, Zeitpunkt der Opferung der Tiere, Angaben zu einer erfolgten Organentnahme oder geplanten histologischen Aufarbeitung. Des Weiteren wird der Narkoseverlauf und eventuell auftretende Komplikationen oder Besonderheiten während der Durchführung des Versuchs eingetragen.

Durch den Vermerk einer CD-Nummer auf dem Versuchsprotokoll beziehungsweise durch Angabe von CD-Nummer, Versuchsdatum und Projektbezeichnung auf der CD selbst, können die Aufzeichnungen schnell und übersichtlich dem entsprechenden Versuch zugeordnet werden. Jede einzelne Filmsequenz ("Track") auf der CD entspricht einer fortlaufenden Zahl des Zählerstands auf dem CD-Recorder. Dadurch ist genau festgelegt, welche Aufnahmen zu welchem Tier gehören. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgt in einem abgedunkelten Raum und läuft bei beiden Verletzungsmodellen ähnlich ab. Die Dauer jeder Filmsequenz beträgt 30 Sekunden.

Auswertung an der Arteria carotis communis:

Zuerst wird der Gefäßdurchmesser der rechten und linken Arteria carotis communis mittels einer Schablone mit angepasstem Maßstab auf dem Monitor ausgemessen. Anschließend erfolgt, ebenfalls mit einer Schablone, die Auszählung der Zellen an der Ligaturstelle in den einzelnen Filmsequenzen.. Die Schablone verfügt über ein Fenster, welches bei 200-facher Vergrößerung umgerechnet eine definierte Größe von 150 µm Länge und 100 µm Breite aufweist.

Auswertung am Dünndarm:

Zunächst wird der Gefäßdurchmesser jeweils einer Arteriole und einer Venole aus dem Bereich des ischämischen Darmsegments pro Filmsequenz mittels einer maßstabsgetreuen

Schablone bestimmt. Danach werden die Zellen mit Hilfe einer gefensterten Schablone (150 µm x 100 µm) bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt.

Die zu zählenden Zellen werden bei beiden Verletzungsmodellen in drei Gruppen eingeteilt und ihre jeweilige Anzahl pro Track in eine Tabellenvorlage eingetragen. Die erste Gruppe umfasst die transient adhärenen Zellen, welche darüber definiert werden, dass sie kürzer als 15 Sekunden am Endothel haften bleiben. Zellen, die mindestens 15 Sekunden oder länger an einer Endothelstelle haften, werden der Gruppe der adhärenen Zellen zugeordnet. Die dritte Gruppe beinhaltet alle Zellen, welche über die gesamte Strecke des Auszählfensters (100 µm) rollen.

3.2.9 Statistische Berechnungen

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM, "Standard error of the mean") angegeben. Der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dient zur Berechnung der Streuung der Mittelwerte. SEM wird als Quotient aus der Standardabweichung und der Wurzel des Stichprobenumfangs definiert.

Die statistischen Berechnungen erfolgen mit Hilfe eines Statistikprogramms (Programm GraphPad Prism, Version 3.0, Fa. GraphPad Software Incorporated). Es wird ein unverbundener Test herangezogen. Die Mittelwerte der einzelnen Versuchs- und Kontrollgruppen werden mit dem t-Test verglichen und auf ihre Signifikanz hin überprüft. Dabei gilt ein p-Wert von $p < 0,05$ als signifikant und ist in den Schaubildern mit einem Stern markiert.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Allgemeine Darstellung der Versuche

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden an sechs bis acht Wochen alten Wildtypmäusen (C57Bl/6J) durchgeführt. Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurden an zwei Modellen die Interaktionen der verabreichten, fluoreszenzmarkierten Zellen mit dem geschädigten Gefäßendothel dargestellt. Bei den Modellen handelt es sich zum einen

um ein ligaturinduziertes Verletzungsmodell der Arteria carotis communis und zum anderem um ein Ischämie-Reperusionsmodell des Dünndarms.

Wie in Kapitel 3.2.1 ausführlich beschrieben, wurden drei Zelltypen herangezogen: humane Monozyten, humane Thrombozyten und humane hämatopoetische CD34⁺ Stammzellen. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit einem der blockierenden Antikörper, anti-CXCR4 oder anti-CXCR7, beziehungsweise der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG_{2B} oder IgG₁) vorinkubiert. Bei den CD34⁺ Zellen gibt es außerdem aufgrund der Ergebnisse in der mit anti-CXCR4 beziehungsweise anti-CXCR7 vorinkubierten Gruppe an CD34⁺ Zellen für das Carotismodell eine Gruppe, in der eine Behandlung der CD34⁺ Zellen mit der Kombination aus anti-CXCR4 und anti-CXCR7 erfolgt. Da damit allerdings kein zusätzlicher Effekt erzielt werden konnte, wurde auf diese Gruppe im Darmmodell verzichtet.

Die einzelnen Versuchsgruppen sind für beide Modelle in *Tab. 1 und Tab. 2* (siehe Kap. 3.2.1) dargestellt.

Bei der Interaktion der Zellen mit dem Gefäßendothel wird zwischen drei verschiedenen Arten unterschieden. Dabei werden Zellen, die kürzer als 15 Sekunden am Endothel haften, als transient adhären definiert. Alle Zellen, die dagegen mindestens 15 Sekunden oder länger an derselben Stelle der Gefäßwand haften, werden zu den adhären Zellen gezählt. In die Gruppe der sogenannten "Roller" gehören alle Zellen, die über die gesamte Strecke des Auszählfensters (100 µm) rollen.

Die in den folgenden Kapiteln dargestellten Schaubilder zeigen die Ergebnisse der ausgezählten humanen Monozyten, Thrombozyten oder CD34⁺ Zellen, die eine Interaktion mit der Gefäßwand eingehen. Während im Carotismodell die Auszählung in den Carotiden erfolgt, werden im Darmmodell die Zellen sowohl in den Arteriolen als auch in Venolen gezählt. Es sei vorweg erwähnt, dass die Auszählung der rollenden Zellen im Carotismodell bei allen drei Zellarten eine zu vernachlässigende Anzahl an Rollern ergab und auf eine Darstellung der Übersicht halber daher verzichtet wird.

Die nachfolgenden Abbildungen stellen Beispielaufnahmen aus den einzelnen Versuchsgruppen beider Verletzungsmodelle zu verschiedenen Aufnahmezeitpunkten dar. Dabei markieren die weißen Pfeile beispielhaft eine Auswahl an fluoreszenzmarkierten Zellen, die sich als helle weiße Punkte farblich von der Gefäßwand abheben. Der weiße

Balken in der rechten unteren Ecke auf allen Abbildungen dient als Maßstab. Bei einer festgelegten Bildbreite von 498 μm entspricht die Balkenlänge 30 μm .

Die Angabe der Zellzahl erfolgt in allen Diagrammen als Anzahl der Zellen pro mm^2 Gefäßwandfläche zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben, der zur Berechnung der Streuung der Mittelwerte dient.

Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Werte gelten stets als signifikant für $p < 0,05$.

Dagegen bedeutet n.s. (nicht signifikant), dass kein signifikanter Unterschied zwischen den zu vergleichenden Gruppen besteht.

3.3.2 Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Monozyten

3.3.2.1 Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Monozyten im ligaturinduzierten Verletzungsmodell der Arteria carotis communis

3.3.2.1.1 Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle

Die folgenden Schaubilder (Abb. 18 und 19) zeigen die Verteilung der mit dem blockierenden Antikörper anti-CXCR4 vorinkubierten humanen Monozyten, im Vergleich zu humanen Monozyten, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG_{2B}) vorbehandelt wurden.

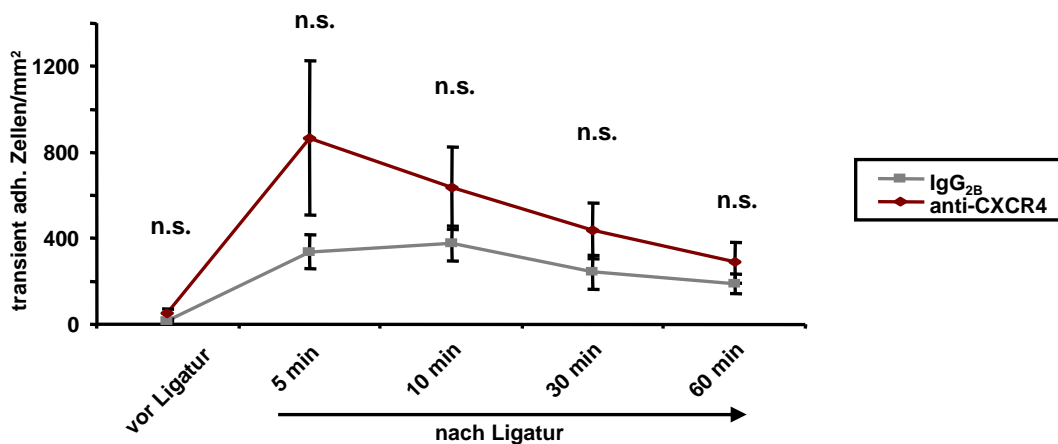


Abb. 18: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR4: n=6; IgG_{2B}: n=10). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

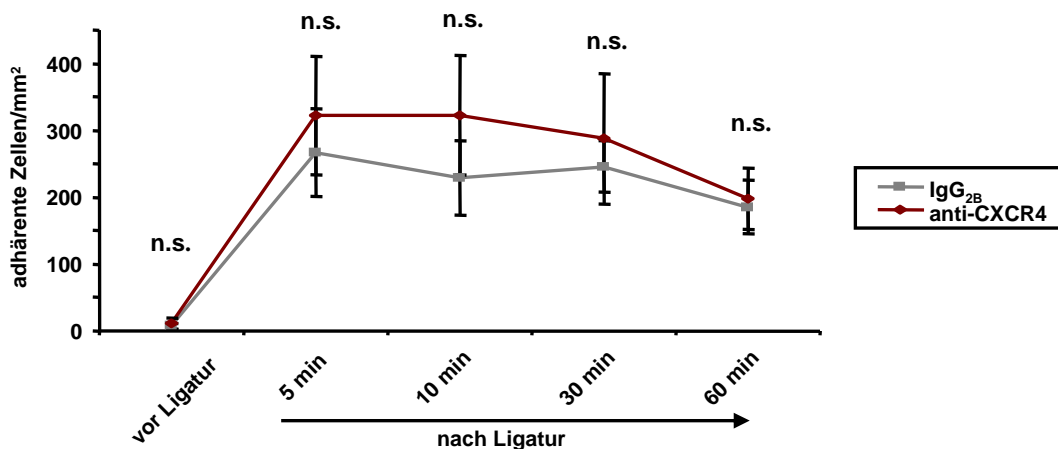


Abb. 19: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR4: n=6; IgG_{2B}: n=10). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

Der Anteil der Zellen, welche eine transient adhärenente Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, ist in der Gruppe der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Monozyten etwas höher als in der Gruppe der Monozyten, die mit der Isotypkontrolle vorbehandelt wurden (transient adhärenente Monozyten mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[48,0 \pm 21,6 \text{ (SEM)}; 866,4 \pm 359,3; 634,5 \pm 189,5; 435,7 \pm 128,0; 289,3 \pm 93,9]$ versus transient adhärenente Monozyten mit IgG_{2B} [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[17,8 \pm 3,7; 338,5 \pm 79,5; 376,0 \pm 81,6; 242,535 \pm 77,2; 188,3 \pm 44,1]$).

Es kommt eine etwas höhere Anzahl an adhärenenten Zellen in der Gruppe der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Monozyten vor (adhärenente Monozyten mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[11,6 \pm 8,6 \text{ (SEM)}; 323,0 \pm 88,2; 323,0 \pm 89,5; 287,5 \pm 97,1; 198,0 \pm 45,0]$ versus adhärenente Monozyten mit IgG_{2B} [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[7,5 \pm 4,0; 266,9 \pm 65,8; 228,8 \pm 55,4; 245,8 \pm 38,6; 185,2 \pm 40,1]$).

Tendenziell ergibt die Auszählung bei beiden Interaktionstypen eine höhere Anzahl an Monozyten in der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Gruppe. Allerdings liegen zu keinem Zeitpunkt nach Lösen der Ligatur signifikante Unterschiede im Vergleich zur Isotypkontrolle vor.



Abb. 20.1: Monozyten mit anti-CXCR4 vor Ligatur.

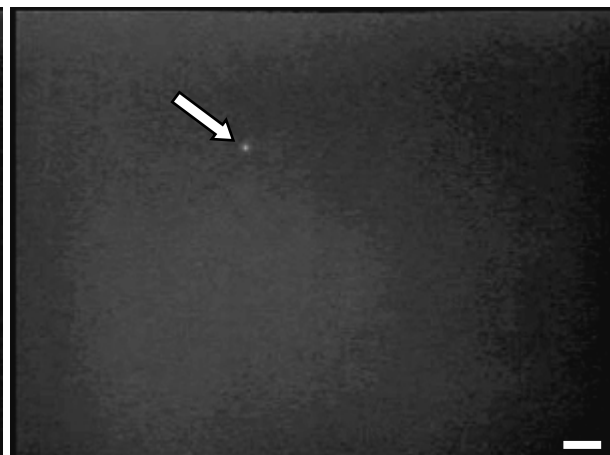


Abb. 20.2: Monozyten mit IgG_{2B} vor Ligatur.

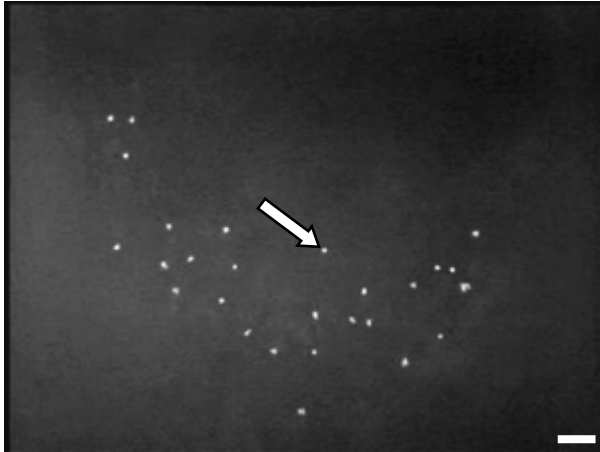


Abb. 20.3: Monozyten mit anti-CXCR4
10 Minuten nach Ligatur.

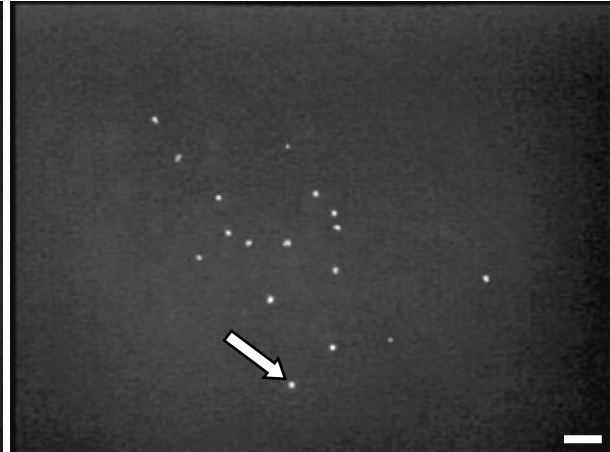


Abb. 20.4: Monozyten mit IgG_{2B}
10 min nach Ligatur.

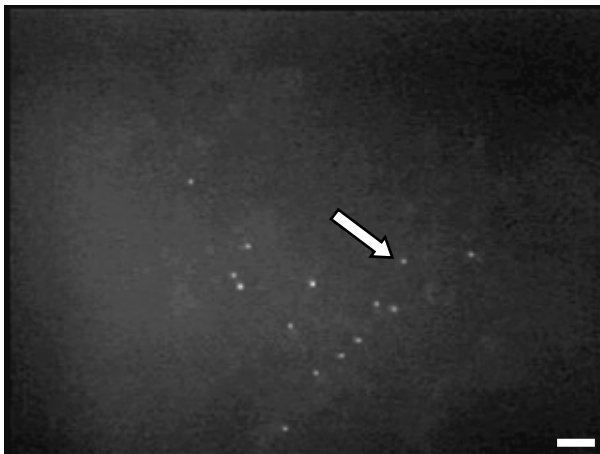


Abb. 20.5: Monozyten mit anti-CXCR4
30 Minuten nach Ligatur.



Abb. 20.6: Monozyten mit IgG_{2B}
30 Minuten nach Ligatur.

3.3.2.1.2 Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle

Die folgenden Schaubilder (Abb. 21 und 22) zeigen die Verteilung der Monozyten, die mit dem blockierenden Antikörper anti-CXCR7 vorinkubiert wurden im Vergleich zu humanen Monozyten, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG₁) vorbehandelt worden sind.

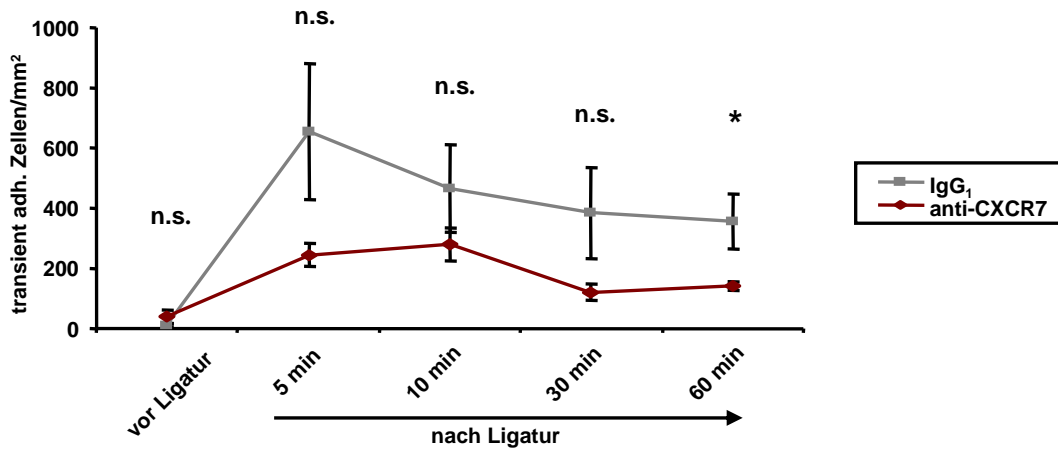


Abb. 21: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR7: $n=6$; IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

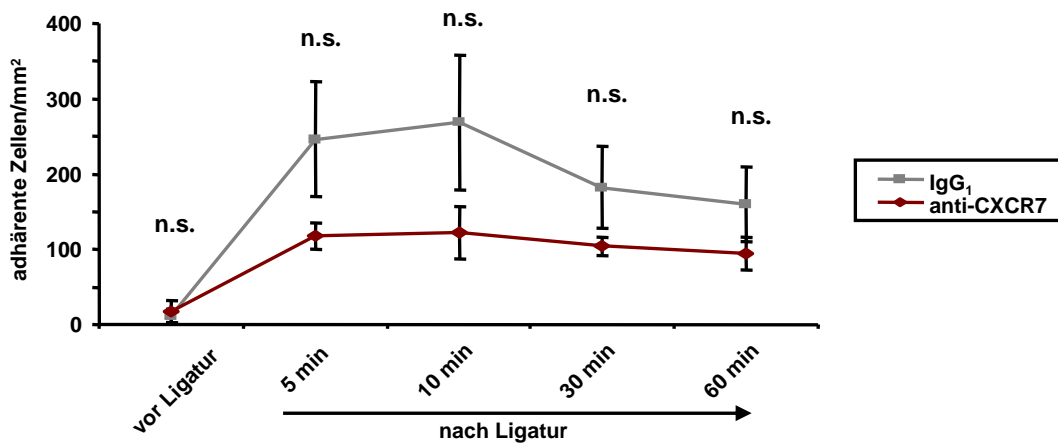


Abb. 22: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR7: $n=6$; IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

In der Gruppe der mit anti-CXCR7 vorinkubierten Monozyten kommen weniger transient adhärente Zellen vor als in der Kontrollgruppe (transient adhärente Monozyten mit anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[40,6 \pm 21,4 \text{ (SEM)}; 244,8 \pm 38,7; 279,6 \pm 53,6; 121,6 \pm 27,5; 140,6 \pm 14,6]$ versus transient adhärente Monozyten mit IgG₁ [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[11,5 \pm 5,8; 654,7 \pm 224,2; 465,0 \pm 146,2; 385,0 \pm 151,0; 357,2 \pm 90,2]$).

Die Anzahl der adhärenenten Zellen ist bei den mit anti-CXCR7 vorbehandelten Monozyten geringer im Vergleich zu den Monozyten mit der Isotypkontrolle (adhärenente Monozyten mit anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[17,4 \pm 14,2 \text{ (SEM)}; 117,6 \pm 17,6; 122,3 \pm 35,5; 104,1 \pm 12,8; 94,4 \pm 22,2]$ versus adhärenente Monozyten mit IgG₁

[vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: [$11,5 \pm 8,6$; $246,4 \pm 76,6$; $268,586 \pm 89,8$; $182,0 \pm 54,7$; $159,7 \pm 49,5$]).

In den beiden Schaubildern mit der Verteilung der transient adhärenenten und adhärenenten Monozyten zeigen die Kurven, dass der Anteil der mit dem Antikörper anti-CXCR7 vorinkubierten Monozyten jeweils niedriger ist. Bis auf den 60 Minuten Zeitpunkt nach Lösen der Ligatur bei den transient adhärenenten Monozyten liegen jedoch keine signifikanten Unterschiede vor.

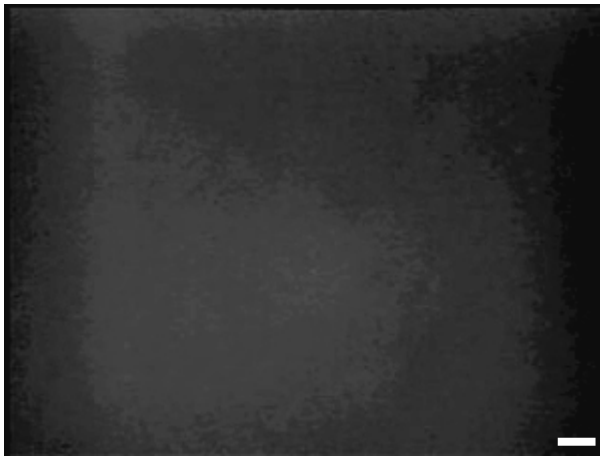


Abb. 23.1: Monozyten mit anti-CXCR7 vor Ligatur.



Abb. 23.2: Monozyten mit IgG₁ vor Ligatur.



Abb. 23.3: Monozyten mit anti-CXCR7 10 Minuten nach Ligatur.

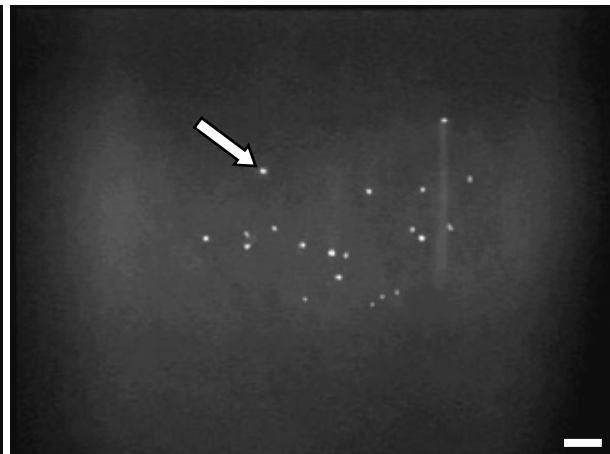


Abb. 23.4: Monozyten mit IgG₁ 10 Minuten nach Ligatur.

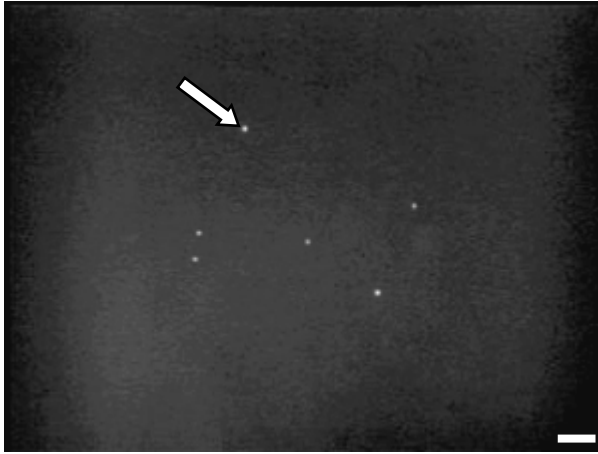


Abb. 23.5: Monozyten mit anti-CXCR7
30 Minuten nach Ligatur.

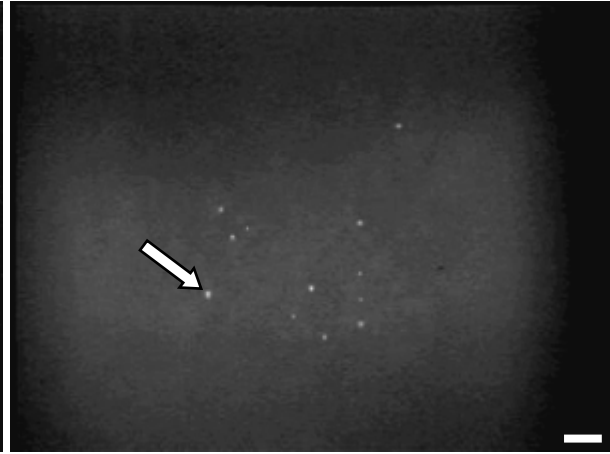


Abb. 23.6: Monozyten mit IgG₁
30 Minuten nach Ligatur.

3.3.2.2 Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Monozyten im Ischämie-Reperfusionsmodell des Dünndarms

3.3.2.2.1 Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle in den Venolen

Die folgenden Schaubilder (Abb. 24, 25 und 26) zeigen die Verteilung der mit anti-CXCR4 vorinkubierten humanen Monozyten in den Venolen verglichen mit humanen Monozyten, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG_{2B}) vorbehandelt wurden.

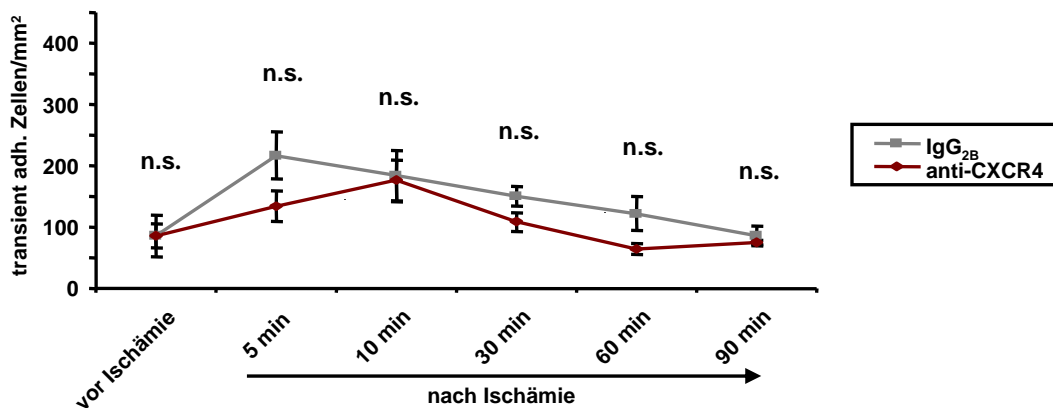


Abb. 24: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR4: n=5; IgG_{2B}: n=5). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

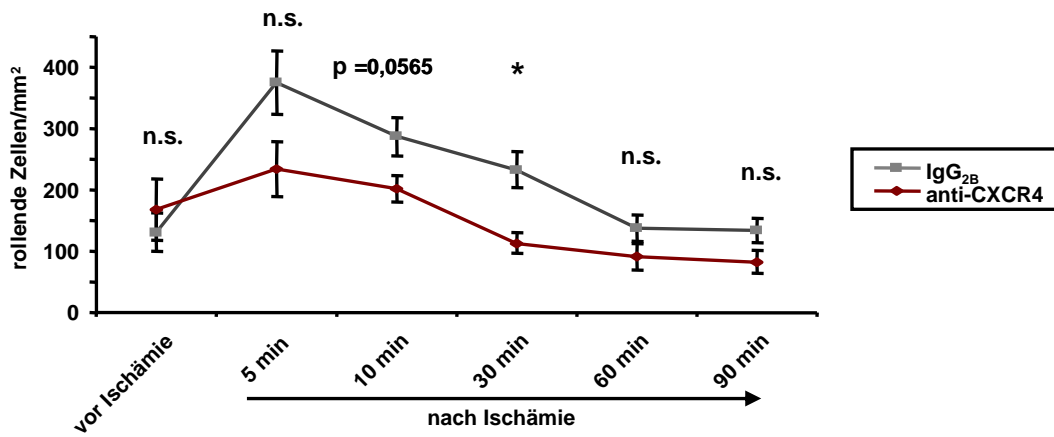


Abb. 25: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR4: n=5; IgG_{2B}: n=5). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

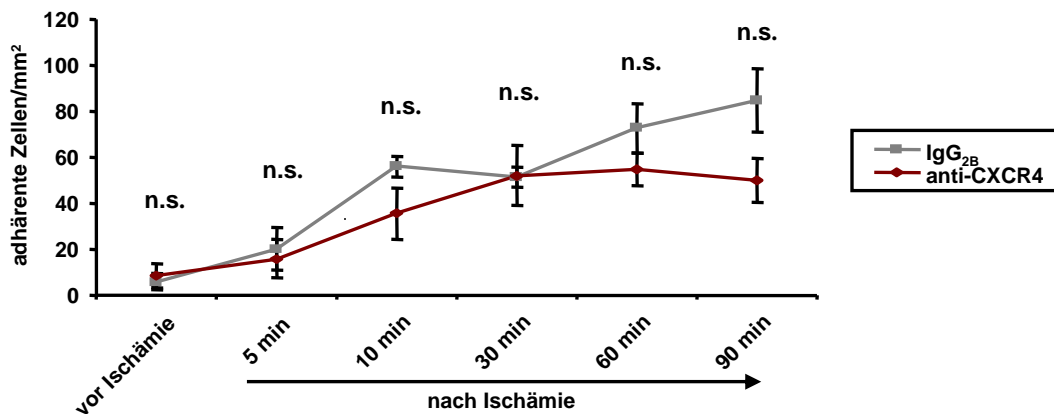


Abb. 26: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR4: n=5; IgG_{2B}: n=5). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

Der Anteil der transient adhärenter Zellen macht in der Gruppe der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Monozyten einen etwas kleineren Anteil aus als in der Gruppe der Monozyten mit der Isotypkontrolle (transient adhärenter Monozyten mit anti-CXCR4 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[86,1 \pm 20,0 \text{ (SEM)}; 133,9 \pm 24,9; 176,0 \pm 33,3; 108,4 \pm 15,7; 64,3 \pm 9,3; 75,2 \pm 4,0]$ versus transient adhärenter Monozyten mit IgG_{2B} [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[85,8 \pm 34,0; 216,8 \pm 38,1; 183,8 \pm 42,1; 150,2 \pm 16,5; 122,3 \pm 28,0; 85,8 \pm 16,7]$).

Es kommt eine etwas geringere Anzahl an rollenden Zellen in der Gruppe der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Monozyten vor (rollende Monozyten mit anti-CXCR4 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[167,8 \pm 50,7 \text{ (SEM)}; 233,5 \pm 44,7; 201,6 \pm 21,9; 113,1 \pm 17,6; 90,5 \pm 21,6; 82,9 \pm 18,7]$ versus rollende Monozyten mit IgG_{2B}

[vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [$131,2 \pm 30,9$; $374,9 \pm 51,7$; $287,0 \pm 31,5$; $232,7 \pm 29,3$; $137,6 \pm 20,6$; $133,4 \pm 19,9$]).

Bei Betrachtung der Auswertung der adhärenenten Monozyten ist erkennbar, dass sich die Anzahl der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Zellen geringfügig von der mit der Isotypkontrolle vorinkubierten Gruppe unterscheidet. Dabei ist der Anteil der Monozyten mit dem blockierenden Antikörper etwas niedriger (adhärente Monozyten mit anti-CXCR4 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [$8,5 \pm 5,3$ (SEM); $15,9 \pm 8,5$; $35,6 \pm 11,3$; $52,1 \pm 13,2$; $54,7 \pm 7,1$; $50,0 \pm 9,6$] versus adhärente Monozyten mit IgG_{2B} [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [$5,9 \pm 3,7$; $20,1 \pm 9,2$; $56,2 \pm 4,5$; $51,4 \pm 4,3$; $72,7 \pm 10,8$; $84,9 \pm 13,8$]).

Bei allen drei Interaktionstypen kommen in der Gruppe der Monozyten, die mit anti-CXCR4 vorinkubiert wurden, weniger Zellen vor. Dabei besteht lediglich im Schaubild der rollenden Monozyten zum 10 Minuten Zeitpunkt nach Eintreten der Reperfusion ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

3.3.2.2.2 Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen

Die folgenden Schaubilder (*Abb. 27, 28 und 29*) stellen einen Vergleich der Verteilung der mit anti-CXCR4 beziehungsweise der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG_{2B}) vorinkubierten Monozyten in den Arteriolen dar.

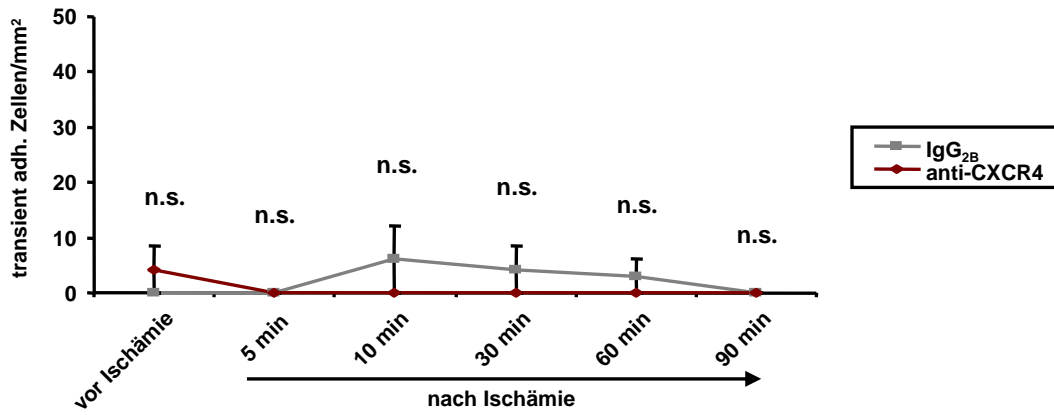


Abb. 27: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR4: $n=5$; IgG_{2B}: $n=5$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

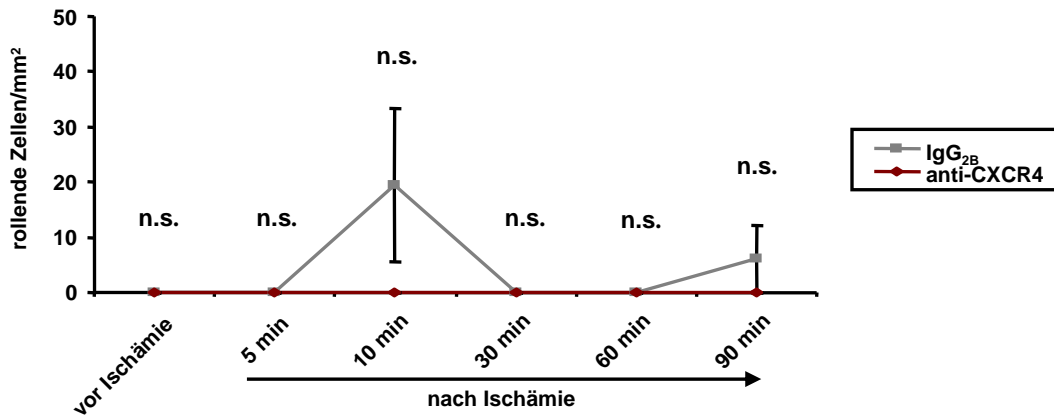


Abb. 28: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR4: $n=5$; IgG_{2B}: $n=5$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

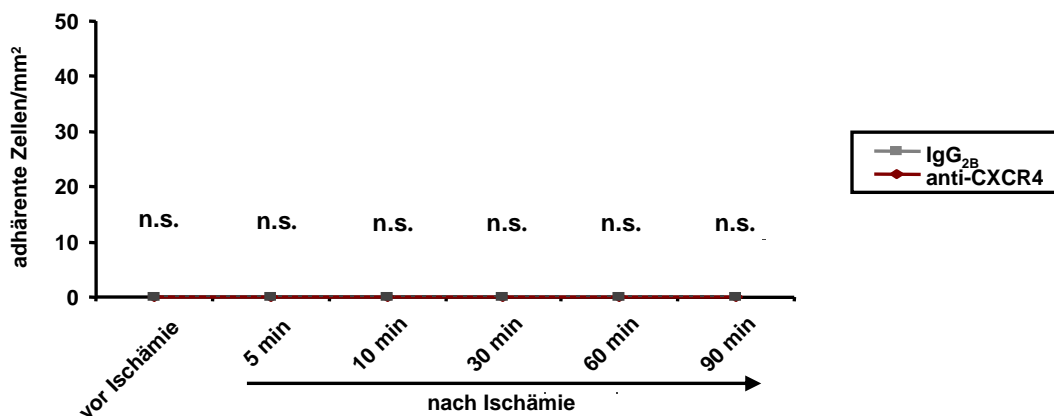


Abb. 29: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR4: $n=5$; IgG_{2B}: $n=5$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

Zu allen Zeitpunkten nach Ischämie, finden sich keine transient adhärenen Monozyten, die mit anti-CXCR4 vorinkubiert wurden. Im Vergleich dazu treten in der mit der Isotypkontrolle vorbehandelten Gruppe transient adhärenen Zellen teilweise auf (transient adhärenen Monozyten mit anti-CXCR4 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[4,2 \pm 4,2 \text{ (SEM)}; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$ versus transient adhärenen Monozyten mit IgG_{2B} [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0; 0 \pm 0; 6,1 \pm 6,1; 4,2 \pm 4,2; 3,0 \pm 3,0; 0 \pm 0]$).

Rollende Monozyten kommen in der Gruppe mit anti-CXCR4 nicht vor und auch in der Gruppe mit den IgG_{2B} voinkubierten Monozyten sind kaum Roller zu beobachten (rollende Monozyten mit anti-CXCR4 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0 \text{ (SEM)}; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$ versus rollende Monozyten mit IgG_{2B} [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0; 0 \pm 0; 19,4 \pm 13,8; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 6,1 \pm 6,1]$).

Monozyten, die eine adhärenen Interaktion mit dem Endothel eingehen, treten in keiner der beiden Gruppen auf.

Bei allen drei Interaktionstypen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festzustellen.

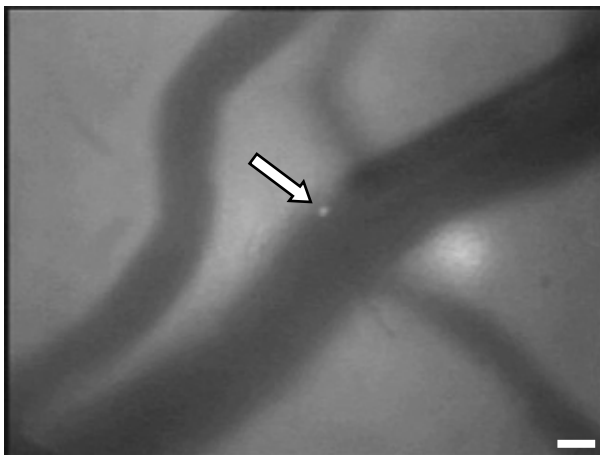


Abb. 30.1: Monozyten mit anti-CXCR4 vor Ischämie.

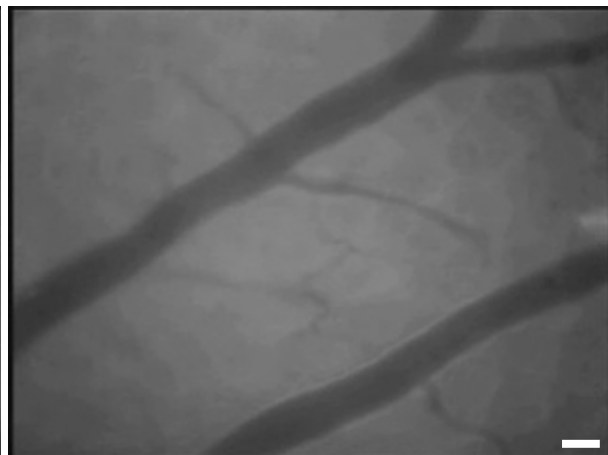


Abb. 30.2: Monozyten mit IgG_{2B} vor Ischämie.



Abb. 30.3: Monozyten mit anti-CXCR4
30 Minuten nach Ischämie.



Abb. 30.4: Monozyten mit IgG_{2B}
30 Minuten nach Ischämie.



Abb. 30.5: Monozyten mit anti-CXCR4
60 Minuten nach Ischämie.

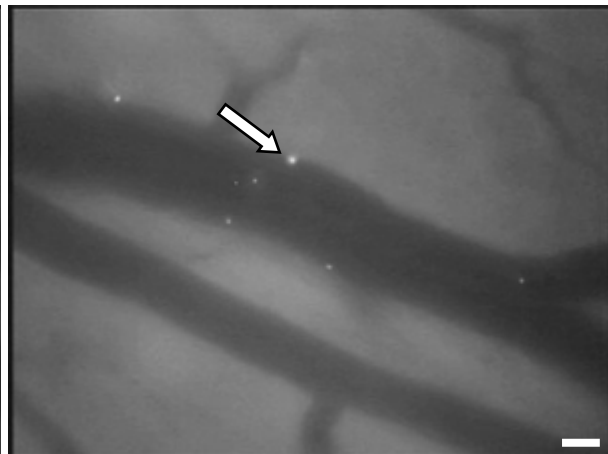


Abb. 30.6: Monozyten mit IgG_{2B}
60 Minuten nach Ischämie.

3.3.2.2.3 Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle in den Venolen

Die folgenden Schaubilder (Abb. 31, 32 und 33) stellen die Verteilung der mit dem blockierenden Antikörper anti-CXCR7 vorbehandelten Monozyten dar im Vergleich zu humanen Monozyten, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG₁) vorinkubiert wurden.

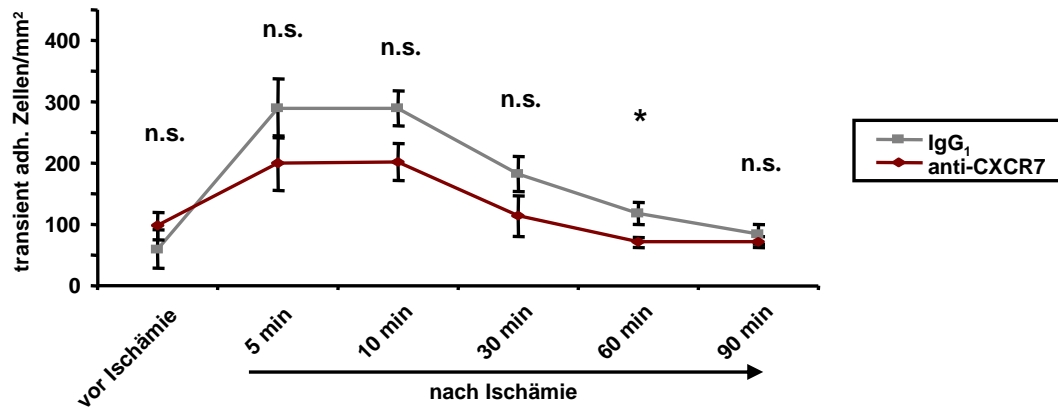


Abb. 31: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR7: $n=6$; IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

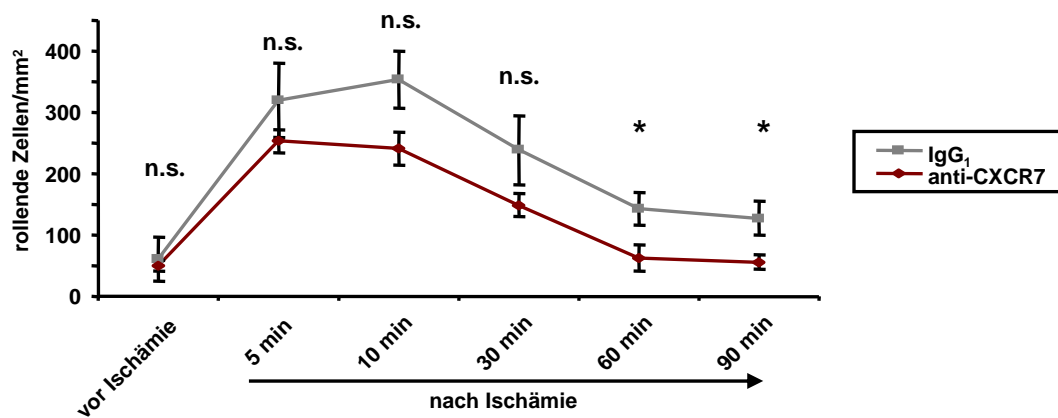


Abb. 32: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR7: $n=6$; IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

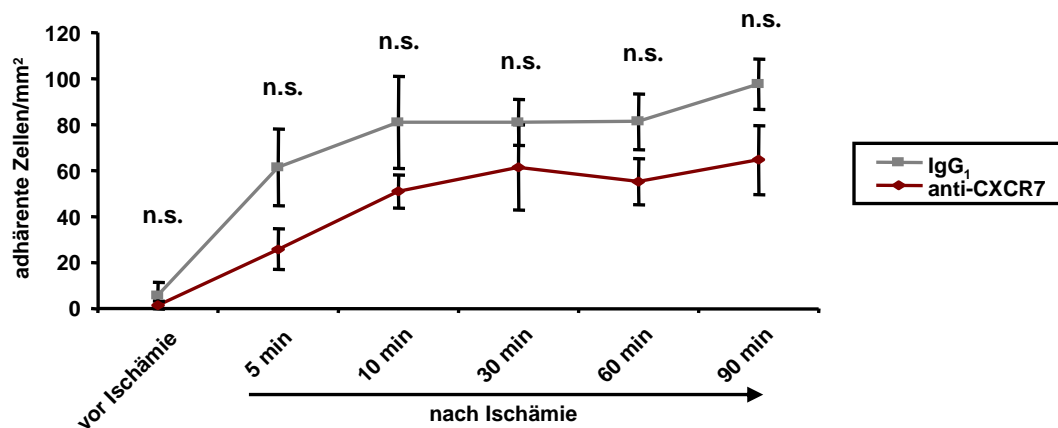


Abb. 33: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR7: $n=6$; IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

In der Gruppe der Monozyten, die mit anti-CXCR7 vorinkubiert wurden, macht die Anzahl an transient adhärenen Zellen einen geringeren Anteil aus als in der Gruppe der Monozyten mit der Isotypkontrolle (transient adhärenente Monozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[97,7 \pm 22,7 \text{ (SEM)}; 200,0 \pm 44,7; 201,9 \pm 29,8; 113,7 \pm 32,9; 71,3 \pm 8,1; 70,7 \pm 9,0]$ versus transient adhärenente Monozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[59,7 \pm 31,0; 289,2 \pm 47,9; 289,3 \pm 29,3; 181,9 \pm 28,4; 118,3 \pm 18,0]$).

Die Verteilung der rollenden Monozyten zeigt einen ähnlichen Verlauf in beiden Gruppen, wobei in der Kontrollgruppe mehr Zellen gezählt wurden (rollende Monozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[50,1 \pm 8,7 \text{ (SEM)}; 253,5 \pm 18,7; 241,0 \pm 26,7; 148,6 \pm 18,9; 62,7 \pm 21,7; 56,1 \pm 11,2]$ versus rollende Monozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[60,9 \pm 35,9; 319,7 \pm 61,0; 353,5 \pm 46,6; 238,7 \pm 56,0; 142,8 \pm 26,5; 127,6 \pm 28,1]$).

Die Anzahl adhärenenter Zellen fällt bei den mit anti-CXCR7 vorbehandelten Monozyten geringer aus verglichen mit den Monozyten, die mit der Isotypkontrolle vorinkubiert wurden (adhärenente Monozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[1,6 \pm 1,6 \text{ (SEM)}; 25,9 \pm 8,8; 50,9 \pm 7,0; 61,3 \pm 18,6; 55,3 \pm 10,0; 64,6 \pm 15,0]$ versus adhärenente Monozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[5,8 \pm 5,8; 61,5 \pm 16,6; 81,0 \pm 19,8; 80,8 \pm 9,9; 81,3 \pm 12,1; 97,7 \pm 11,0]$).

Anhand der Schaubilder der transient adhärenenten, rollenden und adhärenenten Monozyten wird ersichtlich, dass die Anteile der Monozyten mit anti-CXCR7 zu allen Zeitpunkten nach Ischämie geringer sind im Vergleich zur Gruppe der Monozyten mit der Isotypkontrolle. Dabei liegen bei den adhärenenten Monozyten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen vor, während bei den rollenden und transient adhärenenten Monozyten zu bestimmten Zeitpunkten nach Ischämie ein signifikanter Unterschied festzustellen ist.

3.3.2.2.4 Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Monozyten mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen

Die im Folgenden dargestellten Schaubilder (Abb. 34, 35, und 36) zeigen die Verteilung der Monozyten in den Arteriolen, die mit anti-CXCR7 vorinkubierten wurden verglichen mit der IgG₁ vorbehandelten Gruppe an Monozyten.

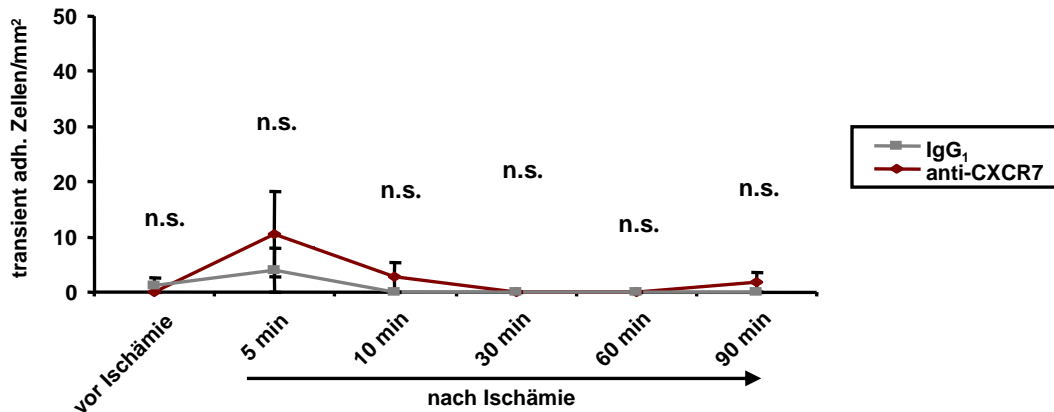


Abb. 34: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR7: n=6; IgG₁: n=6). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

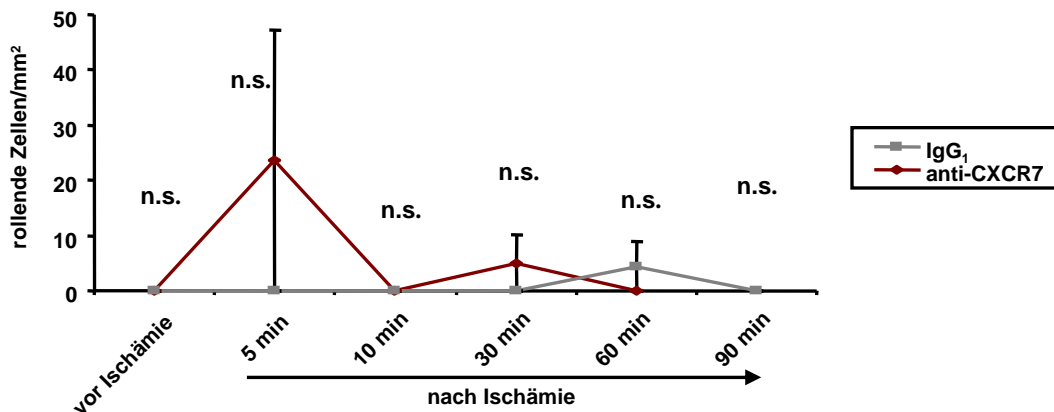


Abb. 35: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR7: n=6; IgG₁: n=6). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

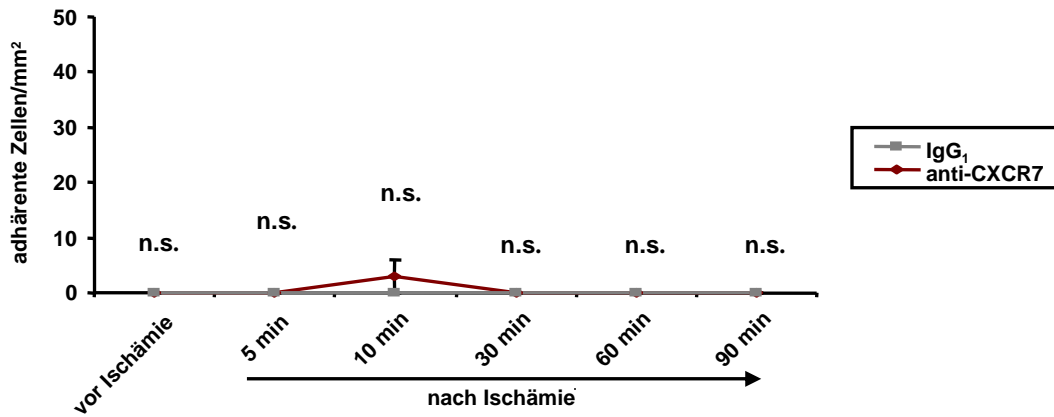


Abb. 36: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR7: n=6; IgG₁: n=6). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

Die Anteile an transient adhärenenten Monozyten sind in beiden Gruppen nahezu identisch (transient adhärenente Monozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0 \text{ (SEM)}; 10,5 \pm 7,8; 2,7 \pm 2,7; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 1,8 \pm 1,8]$ versus transient adhärenente Monozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[1,3 \pm 1,3; 3,9 \pm 3,9; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$).

Bei Betrachtung der rollenden Zellen fallen in der Gruppe mit der Isotypkontrolle bei zwei Zeitpunkten nach Ischämie etwas höhere Zellzahlen auf (rollende Monozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0 \text{ (SEM)}; 23,6 \pm 23,6; 0 \pm 0; 5,1 \pm 5,1; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$ versus rollende Monozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 4,4 \pm 4,4; 0, \pm 0]$).

Die Auswertung der adhärenenten Monozyten lässt erkennen, dass die Zellzahlen in beiden Gruppen einem Wert von Null gleich kommen (adhärenente Monozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0 \text{ (SEM)}; 0 \pm 0; 2,9 \pm 2,9; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$ versus adhärenente Monozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0 \text{ (SEM)}; 0 \pm 0; 0, \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$).

Es kann zu keinem Zeitpunkt bei keiner Interaktionsart ein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

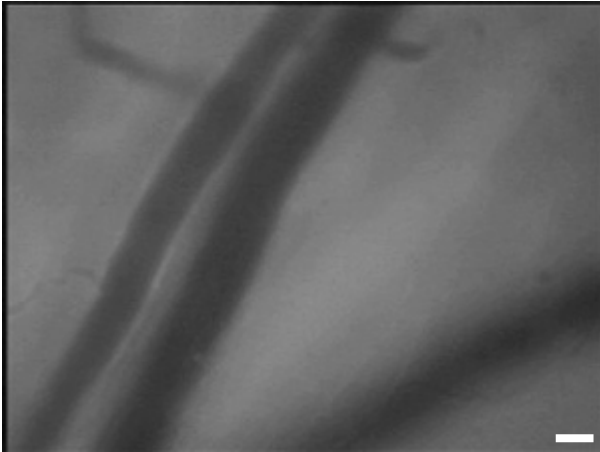


Abb. 37.1: Monozyten mit anti-CXCR7 vor Ischämie.

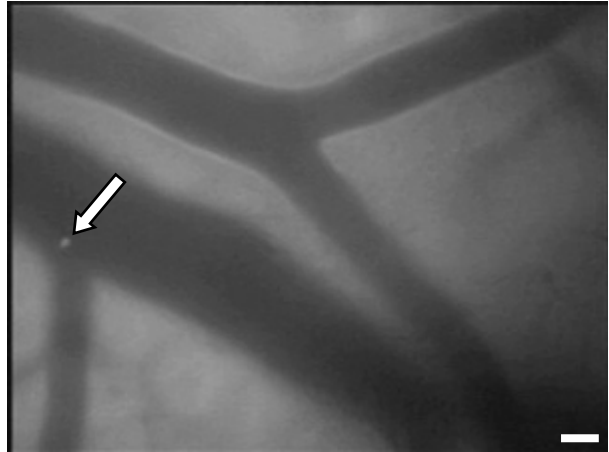


Abb. 37.2: Monozyten mit IgG₁ vor Ischämie.

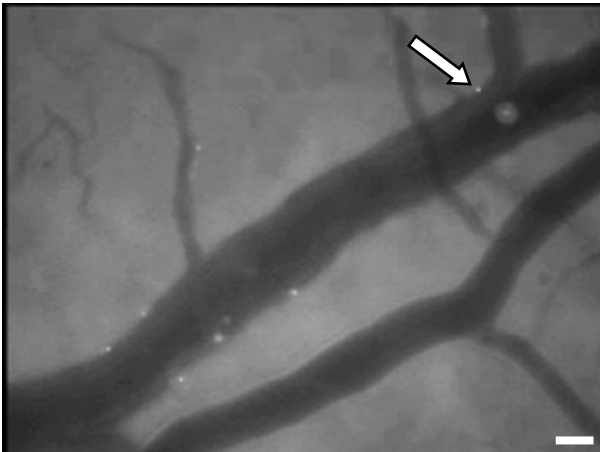


Abb. 37.3: Monozyten mit anti-CXCR7 30 Minuten nach Ischämie.

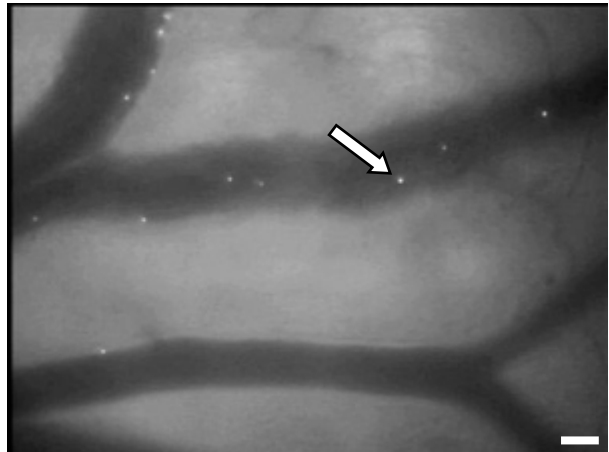


Abb. 37.4: Monozyten mit IgG₁ 30 Minuten nach Ischämie.

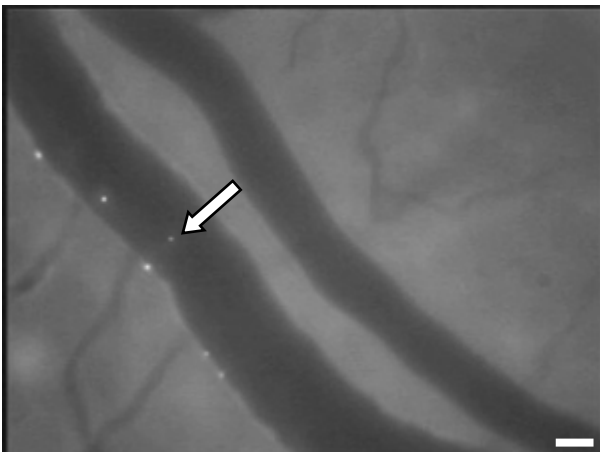


Abb. 37.5: Monozyten mit anti-CXCR7 60 Minuten nach Ischämie.

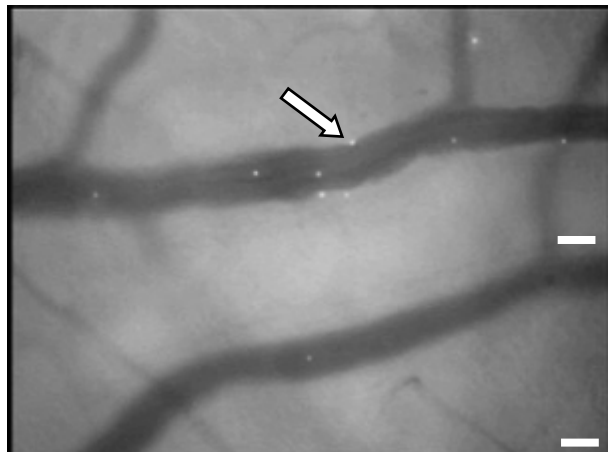


Abb. 37.6: Monozyten mit IgG₁ 60 Minuten nach Ischämie.

3.3.3 Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Thrombozyten

3.3.3.1 Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Thrombozyten im ligaturinduzierten Verletzungsmodell der Arteria carotis communis

3.3.3.1.1 Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle

Die folgenden Schaubilder (Abb. 38 und 39) zeigen die Verteilung der Thrombozyten, die mit dem Antikörper anti-CXCR4 vorinkubiert wurden verglichen mit humanen Thrombozyten, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG_{2B}) vorbehandelt worden sind.

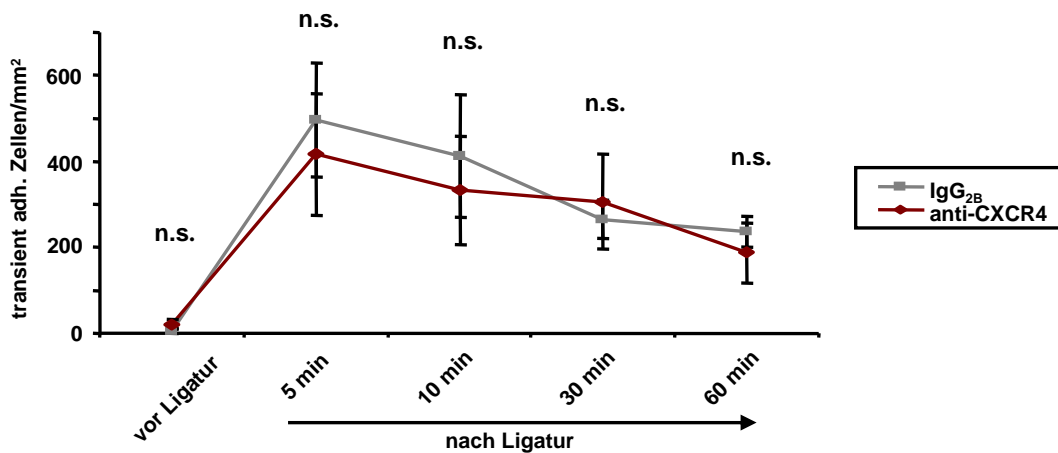


Abb. 38: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR4: n=10; IgG_{2B}: n=6). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

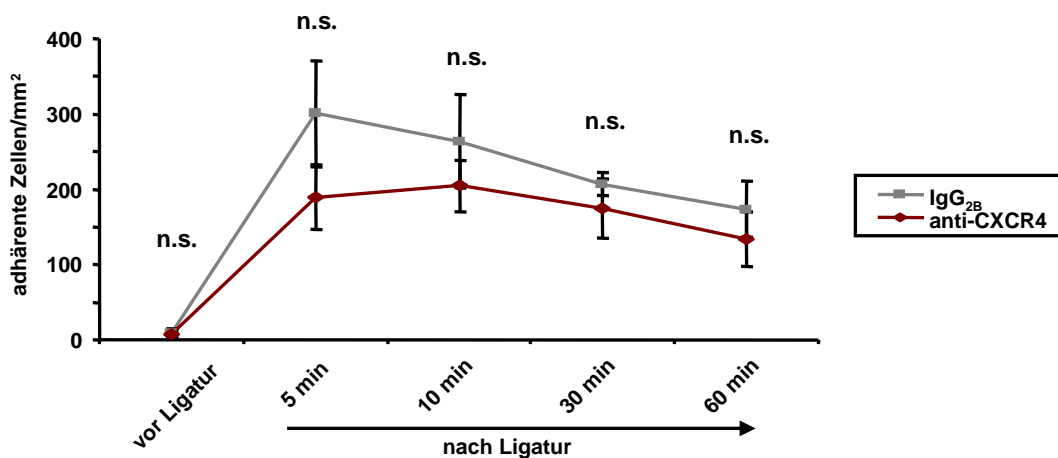


Abb. 39: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR4: n=10; IgG_{2B}: n=6). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

In der Gruppe der Thrombozyten mit anti-CXCR4 sowie in der Gruppe mit der Isotypkontrolle, ist der Anteil der Zellen, die eine transient adhärente Interaktion mit der Gefäßwand eingehen, annähernd gleich hoch (transient adhärente Thrombozyten mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[21,4 \pm 11,2 \text{ (SEM)}; 416,2 \pm 140,8; 332,9 \pm 126,4; 306,3 \pm 111,3; 187,3 \pm 69,2]$ versus transient adhärente Thrombozyten mit IgG_{2B} [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[5,8 \pm 5,8; 497,1 \pm 132,1; 412,9 \pm 141,8; 265,8 \pm 45,4; 236,9 \pm 36,0]$).

Auch in der Anzahl der adhärenenten Thrombozyten bestehen nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (adhärente Thrombozyten mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[6,9 \pm 5,3 \text{ (SEM)}; 189,7 \pm 42,5; 204,7 \pm 33,9; 174,7 \pm 38,8; 133,6 \pm 36,2]$ versus adhärente Thrombozyten mit IgG_{2B} [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[8,7 \pm 5,9; 300,5 \pm 70,2; 263,6 \pm 61,5; 207,1 \pm 15,8; 173,4 \pm 37,0]$).

Aus den beiden Schaubildern mit der Verteilung der transient adhärenenten und adhärenenten Thrombozyten wird ersichtlich, dass die Anzahl der Zellen in der mit anti-CXCR4 vorbehandelten Gruppe bis auf den 30 Minuten Zeitpunkt im Schaubild der transient adhärenenten Thrombozyten geringer ist als die Anzahl der Zellen in der Kontrollgruppe. Es liegen zu keinem Zeitpunkt nach Lösen der Ligatur signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vor.



Abb. 40.1: Thrombozyten mit anti-CXCR4 vor Ligatur.



Abb. 40.2: Thrombozyten mit IgG_{2B} vor Ligatur.

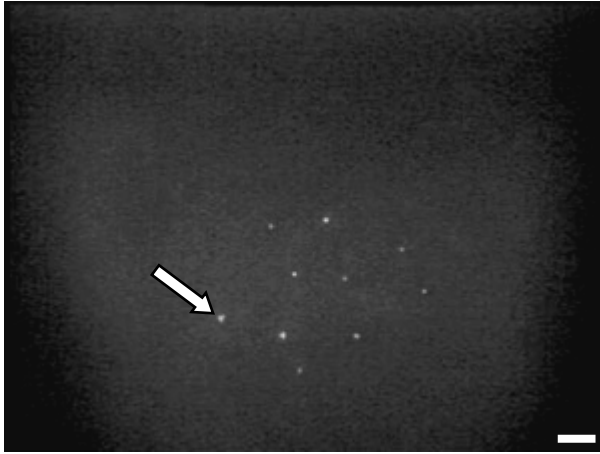


Abb. 40.3: Thrombozyten mit anti-CXCR4
10 Minuten nach Ligatur.

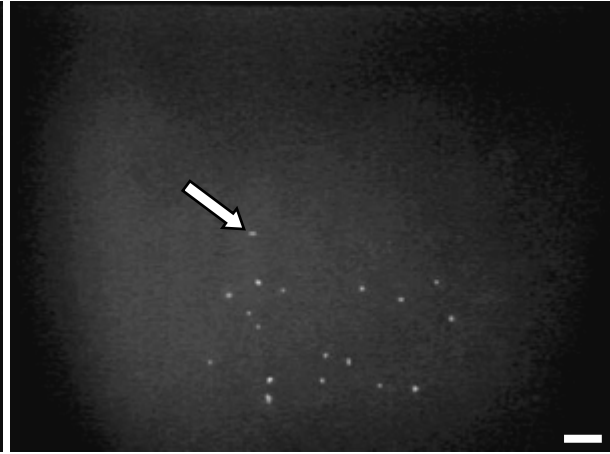


Abb. 40.4: Thrombozyten mit IgG_{2B}
10 Minuten nach Ligatur.

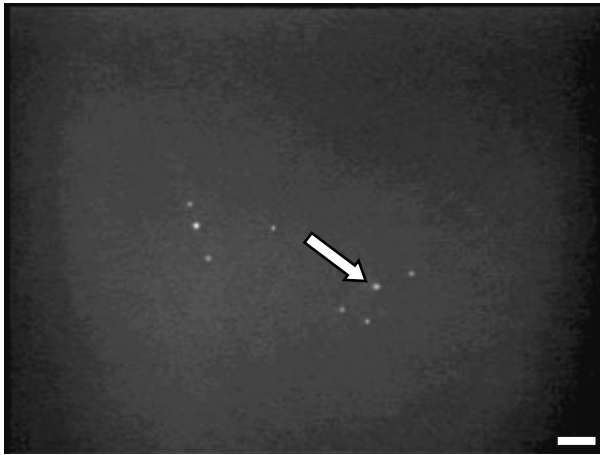


Abb. 40.5: Thrombozyten mit anti-CXCR4
30 Minuten nach Ligatur.

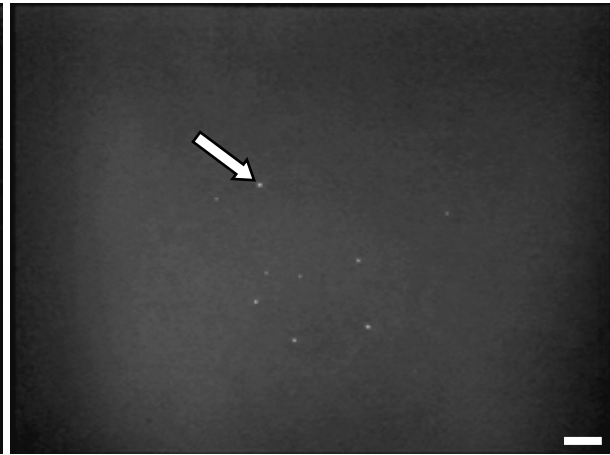


Abb. 40.6: Thrombozyten mit IgG_{2B}
30 Minuten nach Ligatur.

3.3.3.1.2 Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle

Die folgenden Schaubilder (Abb. 41 und 42) zeigen die Verteilung der mit dem blockierenden Antikörper anti-CXCR7 vorinkubierten humanen Thrombozyten, im Vergleich zu humanen Thrombozyten, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG₁) vorbehandelt wurden.

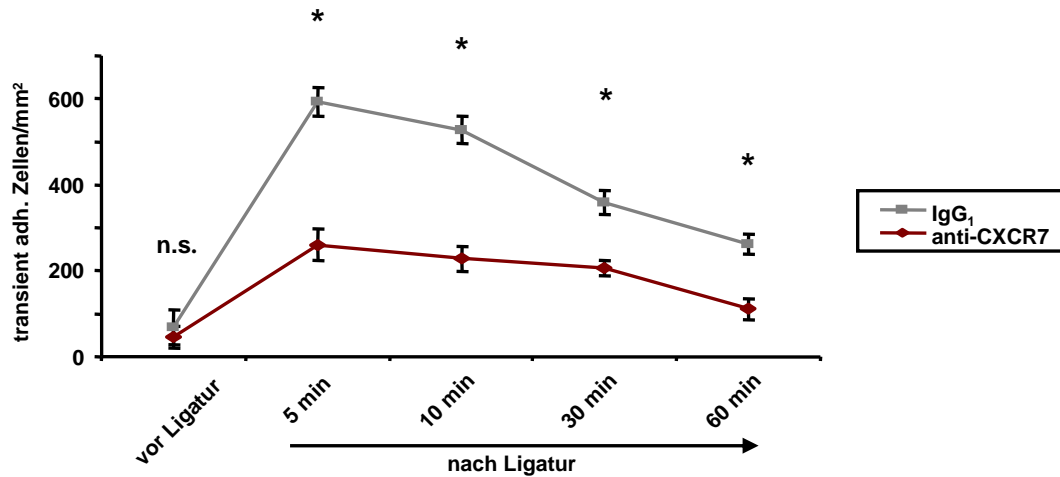


Abb. 41: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR7: $n=8$; IgG₁: $n=8$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

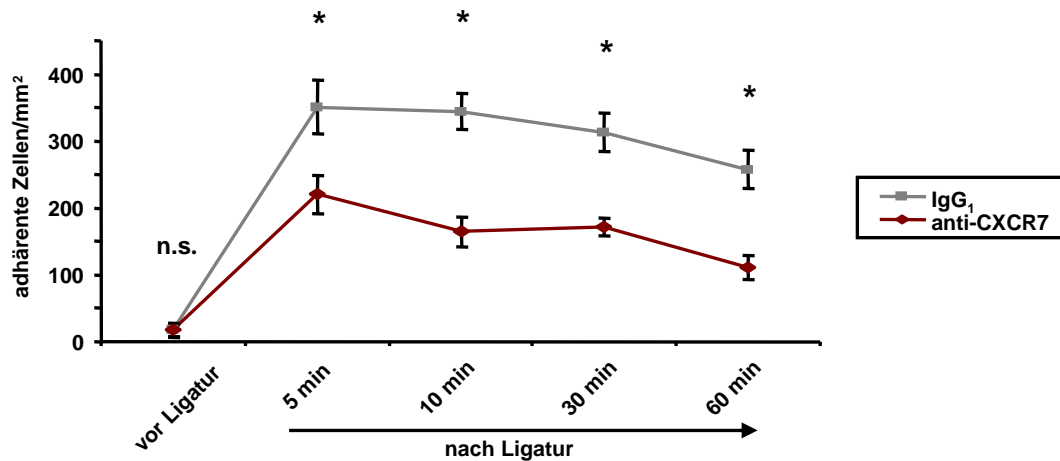


Abb. 42: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR7: $n=8$; IgG₁: $n=8$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

Die beiden Gruppen unterscheiden sich im Auftreten der transient adhärenter Thrombozyten, wobei die Anzahl bei den mit anti-CXCR7 vorinkubierten Zellen geringer ausfällt (transient adhärenter Thrombozyten mit anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[45,7 \pm 25,5 \text{ (SEM)}; 260,9 \pm 35,9; 228,3 \pm 29,4; 206,5 \pm 17,8; 110,8 \pm 24,1]$ versus transient adhärenter Thrombozyten mit IgG₁ [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[69,7 \pm 40,5; 594,3 \pm 33,1; 527,6 \pm 31,7; 358,8 \pm 29,1; 262,4 \pm 23,6]$).

Bei den Thrombozyten, die eine adhärenter Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, kann ein den transient adhärenter Zellen entsprechender Unterschied zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden (adhärenter Thrombozyten mit anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min;

30 min; 60 min nach Ligatur]: $[17,4 \pm 8,7 \text{ (SEM)}; 220,3 \pm 28,8; 164,5 \pm 22,1; 171,7 \pm 13,6; 110,9 \pm 18,0]$ versus adhärenente Thrombozyten mit IgG₁ [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[17,4 \pm 10,4; 350,9 \pm 40,2; 344,2 \pm 27,4; 313,2 \pm 28,7; 257,3 \pm 28,7]$).

Zu allen Zeitpunkten nach Lösen der Ligatur ist die Anzahl sowohl der transient adhärenenten als auch der adhärenenten Thrombozyten, die mit anti-CXCR7 vorbehandelt wurden, signifikant geringer als bei den Thrombozyten in der Gruppe mit der Isotypkontrolle.

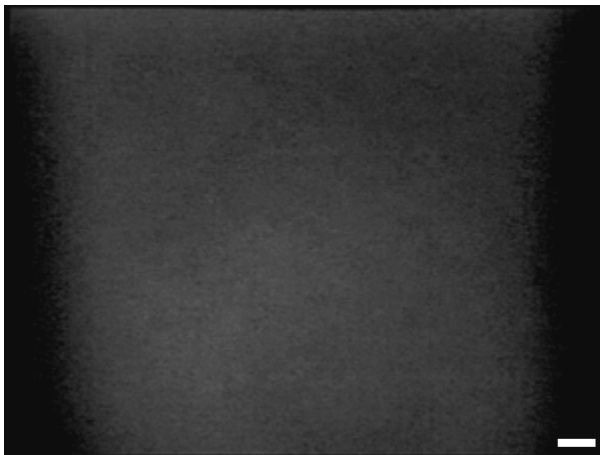


Abb. 43.1: Thrombozyten mit anti-CXCR7 vor Ligatur.

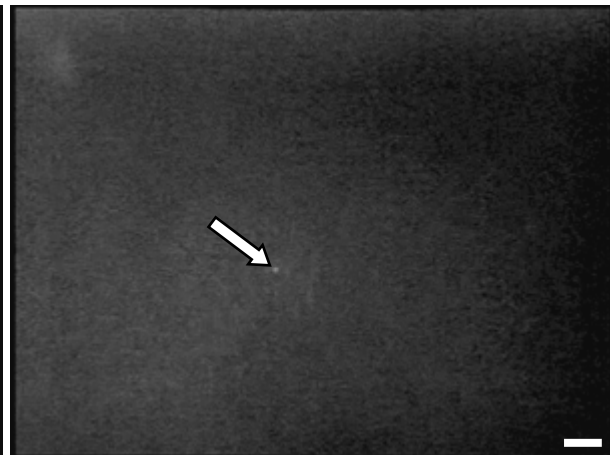


Abb. 43.2: Thrombozyten mit IgG₁ vor Ligatur.

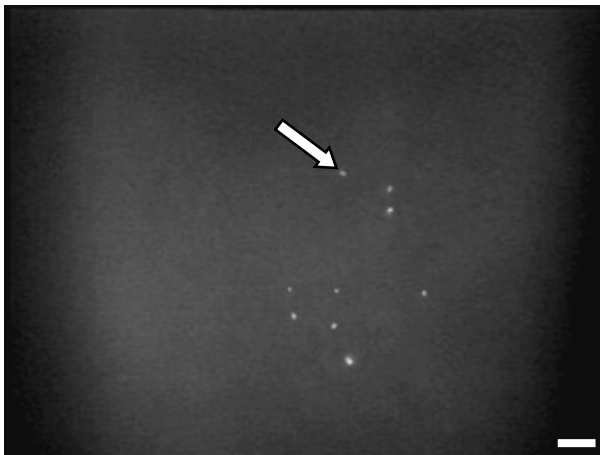


Abb. 43.3: Thrombozyten mit anti-CXCR7 10 Minuten nach Ligatur.

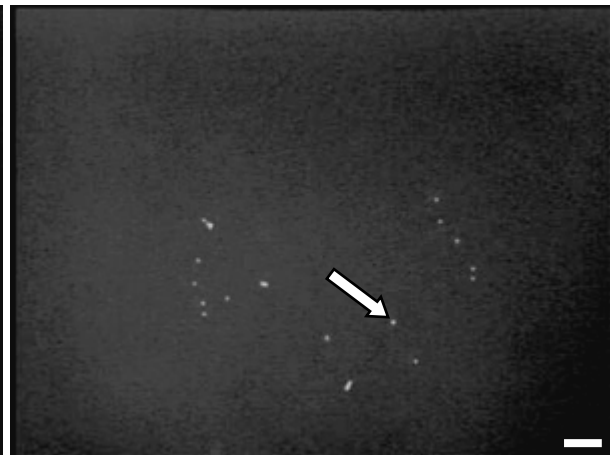


Abb. 43.4: Thrombozyten mit IgG₁ 10 Minuten nach Ligatur.

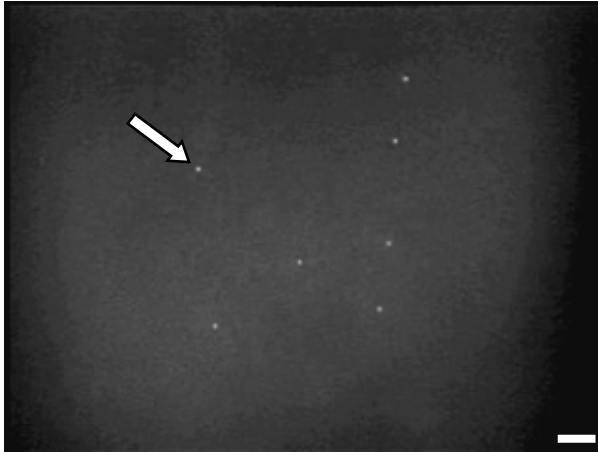


Abb. 43.5: Thrombozyten mit anti-CXCR7
30 Minuten nach Ligatur.

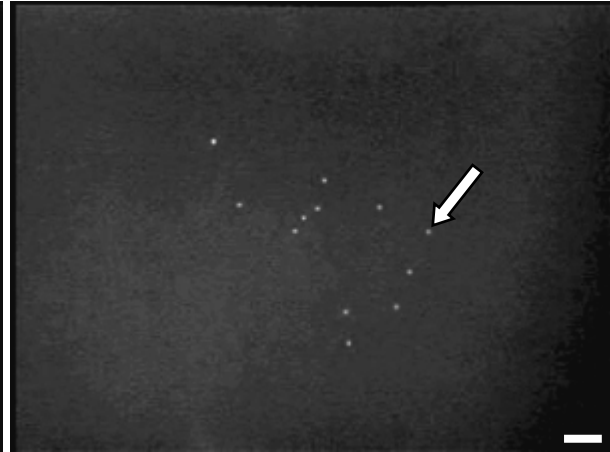


Abb. 43.6: Thrombozyten mit IgG₁
30 Minuten nach Ligatur.

3.3.3.2 Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen Thrombozyten im Ischämie-Reperfusionmodell des Dünndarms

3.3.3.2.1 Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle in den Venolen

Die nachfolgenden Schaubilder (Abb. 44, 45 und 46) zeigen die Verteilung der Thrombozyten in den Venolen, die entweder mit dem Antikörper anti-CXCR4 vorinkubiert wurden oder mit der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG_{2B}).

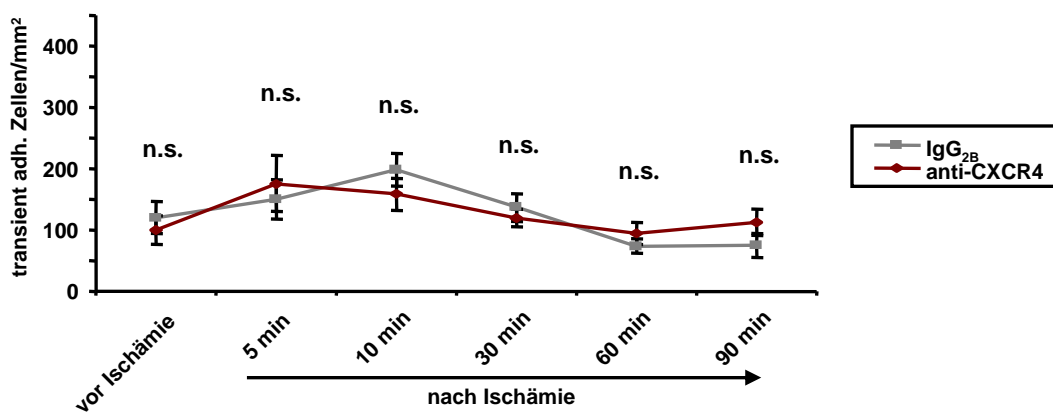


Abb. 44: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR4: n=5; IgG_{2B}: n=5). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

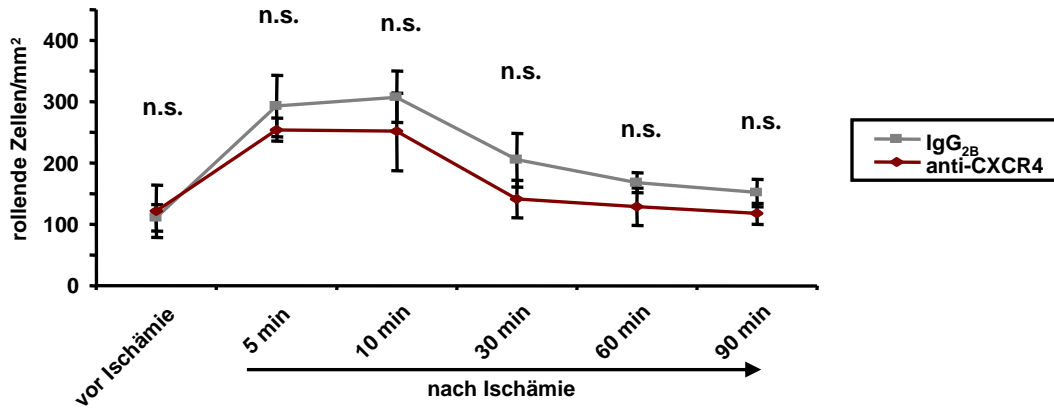


Abb. 45: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR4: n=5; IgG_{2B}: n=5). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

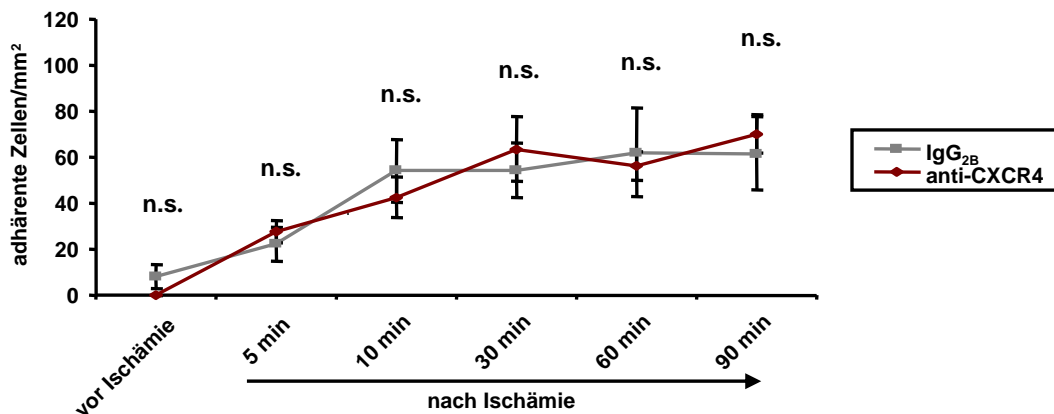


Abb. 46: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR4: n=5; IgG_{2B}: n=5). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

Der nahezu parallele Verlauf der Kurven im Schaubild der transient adhärenenten Thrombozyten zeigt, dass sich der Anteil an Thrombozyten in der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Gruppe kaum von der Gruppe der Thrombozyten, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle vorbehandelt wurden, unterscheidet (transient adhärenente Thrombozyten mit anti-CXCR4 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[99,9 \pm 22,6 \text{ (SEM)}; 175,6 \pm 45,6; 158,4 \pm 25,5; 119,8 \pm 14,8; 94,7 \pm 17,8; 112,5 \pm 21,2]$ versus transient adhärenente Thrombozyten mit IgG_{2B} [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[120,2 \pm 25,4; 150,3 \pm 31,6; 198,0 \pm 27,1; 137,1 \pm 22,7; 74,1 \pm 11,7; 74,9 \pm 19,9]$).

Auch in der Anzahl der rollenden Thrombozyten bestehen nur geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Dabei ist der Anteil der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Zellen etwas geringer (rollende Thrombozyten mit anti-CXCR4 [vor Ischämie; 5 min; 10 min;

30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[120,7 \pm 42,8 \text{ (SEM)}; 254,1 \pm 18,6; 251,0 \pm 62,7; 140,9 \pm 30,8; 128,2 \pm 30,0; 117,1 \pm 17,5]$ versus rollende Thrombozyten mit IgG_{2B} [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[111,0 \pm 21,6; 292,7 \pm 50,4; 308,0 \pm 41,6; 205,1 \pm 43,6; 167,6 \pm 15,9; 151,1 \pm 21,8]$).

Bei den Thrombozyten, die eine adhärenente Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, ist die Anzahl an Zellen in der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Gruppe zu einigen Zeitpunkten nach Ischämie etwas höher (adhärenente Thrombozyten mit anti-CXCR4 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0 \text{ (SEM)}; 27,7 \pm 4,7; 42,5 \pm 8,9; 63,5 \pm 14,1; 56,1 \pm 6,0; 70,2 \pm 8,4]$ versus adhärenente Thrombozyten mit IgG_{2B} [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[8,0 \pm 5,2; 22,2 \pm 7,3; 54,1 \pm 13,6; 54,4 \pm 12,1; 62,1 \pm 19,4; 61,6 \pm 16,1]$).

Bei allen drei Interaktionstypen liegen, außer bei den rollenden Thrombozyten zum 60 Minuten Zeitpunkt nach Ischämie, keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen vor.

3.3.3.2.2 Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen

Die folgenden Schaubilder (Abb. 47, 48 und 49) zeigen die Auswertung der Thrombozyten in den Arteriolen, die mit anti-CXCR4 vorinkubiert wurden im Vergleich zur Gruppe der mit der Isotypkontrolle (IgG_{2B}) vorbehandelten Zellen.

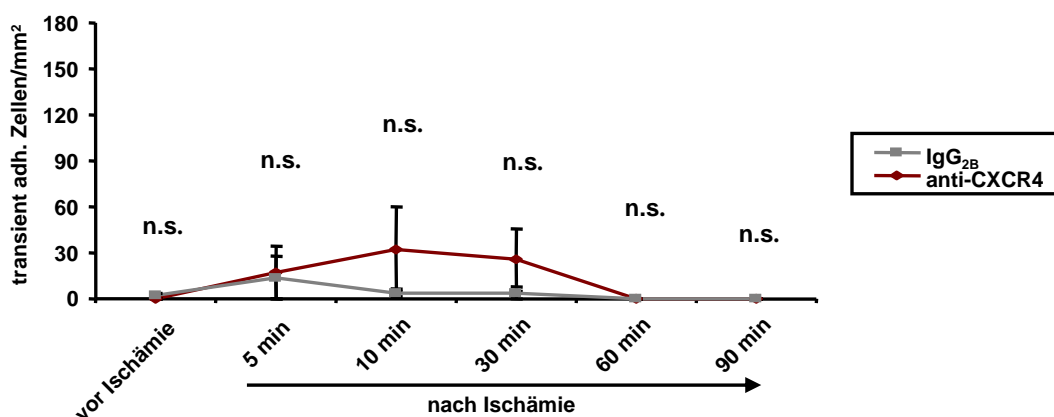


Abb. 47: Anzahl transient adhärenenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR4: n=5; IgG_{2B}: n=5). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

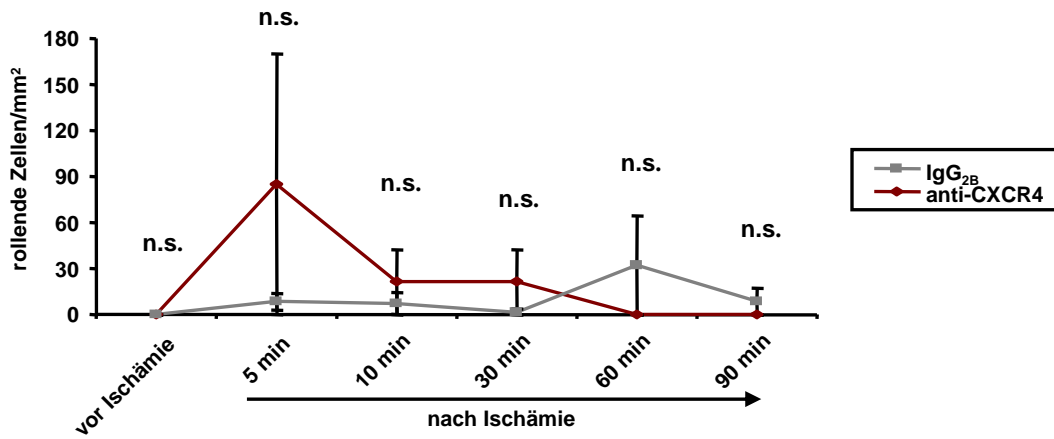


Abb. 48: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR4: n=5; IgG_{2B}: n=5). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

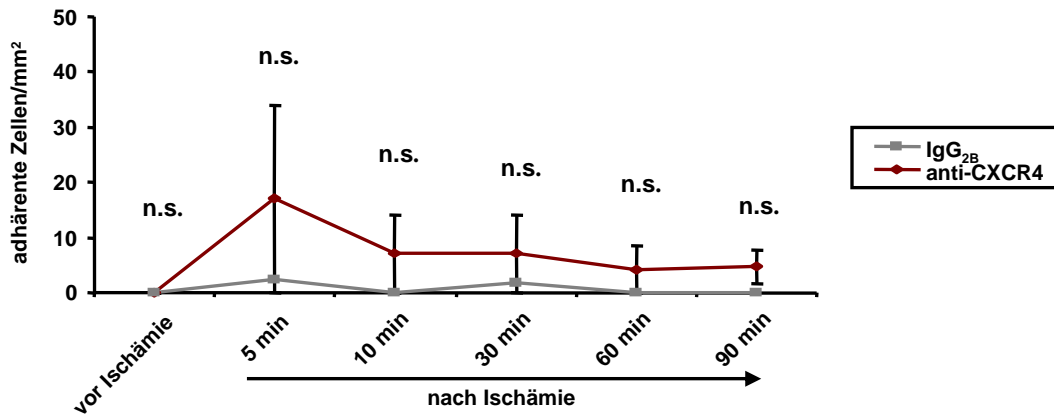


Abb. 49: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR4: n=5; IgG_{2B}: n=5). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

Die mit anti-CXCR4 vorinkubierten Thrombozyten machen bei der Auswertung der transient adhärenter Zellen einen geringfügig höheren Anteil aus (transient adhärenter Thrombozyten mit anti-CXCR4 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0 \text{ (SEM)}; 17,0 \pm 16,0; 32,3 \pm 27,6; 25,5 \pm 20,6; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$ versus transient adhärenter Thrombozyten mit IgG_{2B} [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[1,9 \pm 1,9; 13,8 \pm 13,8; 3,9 \pm 2,399; 3,9 \pm 3,9; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$).

Auch bei den Zellen, die am Endothel rollen, stellt die Gruppe der Thrombozyten, die mit anti-CXCR4 vorinkubiert wurden, einen etwas höheren Anteil dar als die Kontrollgruppe (rollende Thrombozyten mit anti-CXCR4 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0 \text{ (SEM)}; 84,9 \pm 84,8; 21,2 \pm 21,2; 21,2 \pm 21,2; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$ versus rollende Thrombozyten mit IgG_{2B} [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0; 8,3 \pm 5,1; 7,1 \pm 7,1; 1,8 \pm 1,8; 32,1 \pm 32,1; 8,5 \pm 8,5]$).

Zu allen Zeitpunkten nach Ischämie fällt der Anteil der adhärenenten Thrombozyten in der Gruppe mit der Isotypkontrolle geringer aus (adhärenente Thrombozyten mit anti-CXCR4 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0$ (SEM); $17,0 \pm 17,0$; $7,1 \pm 7,1$; $7,1 \pm 7,1$; $4,2 \pm 4,2$; $4,7 \pm 3,1$] versus adhärenente Thrombozyten mit IgG_{2B} [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0$; $2,4 \pm 2,4$; 0 ± 0 ; $1,8 \pm 1,8$; 0 ± 0 ; 0 ± 0]).

Weder bei den transient adhärenenten, noch bei den rollenden und adhärenenten Thrombozyten zeichnen sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen ab.

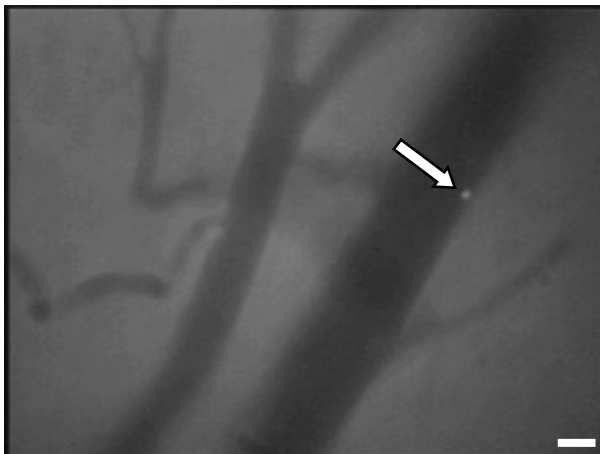


Abb. 50.1: Thrombozyten mit anti-CXCR4 vor Ischämie.

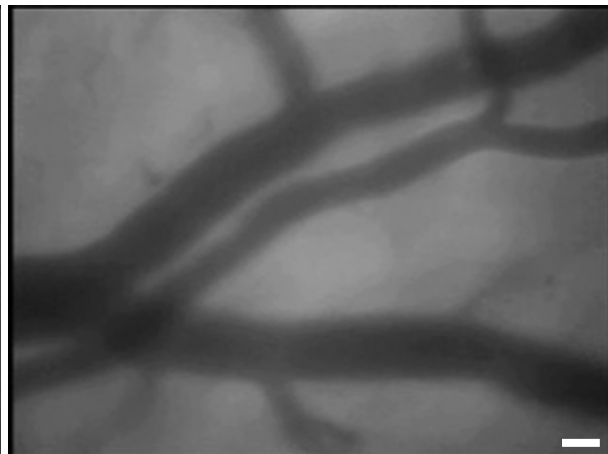


Abb. 50.2: Thrombozyten mit IgG_{2B} vor Ischämie.



Abb. 50.3: Thrombozyten mit anti-CXCR4 30 Minuten nach Ischämie .

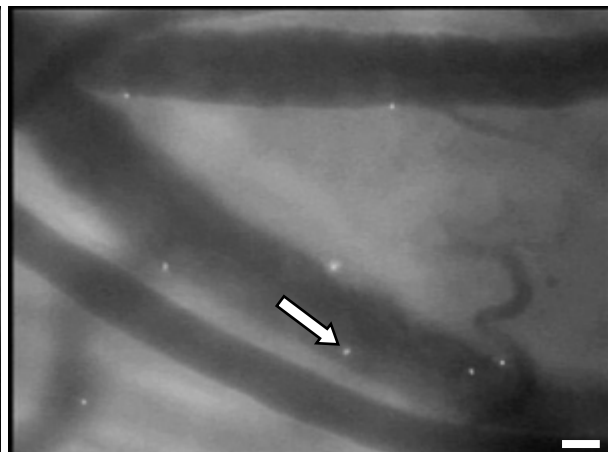


Abb. 50.4: Thrombozyten mit IgG_{2B} 30 Minuten nach Ischämie.

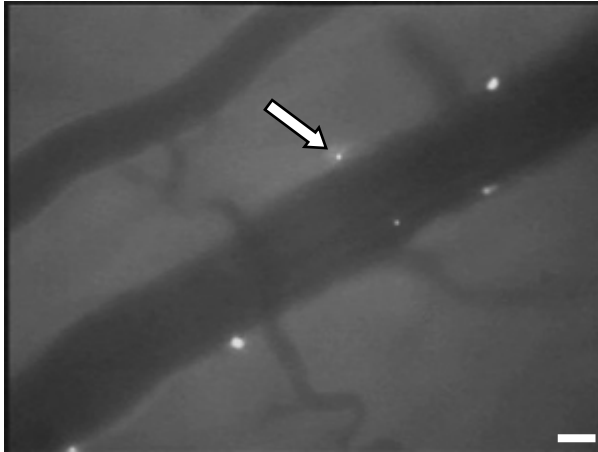


Abb. 50.5: Thrombozyten mit anti-CXCR4
60 Minuten nach Ischämie.

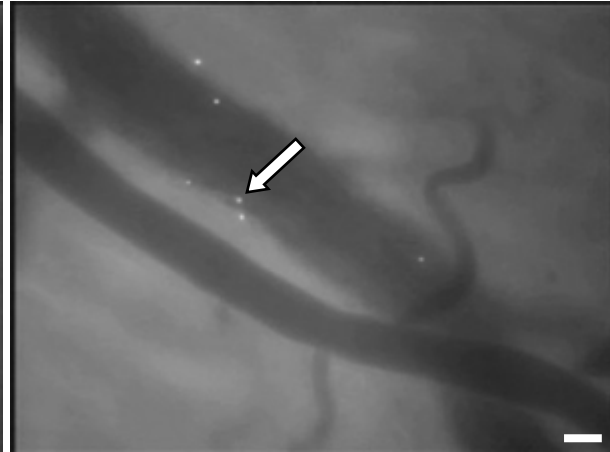


Abb. 50.6: Thrombozyten mit IgG_{2B}
60 Minuten nach Ischämie.

3.3.3.2.3 Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle in den Venolen

Die folgenden Schaubilder (Abb. 51, 52 und 53) zeigen die Verteilung der mit anti-CXCR7 vorinkubierten humanen Thrombozyten in den Venolen, verglichen mit der Gruppe an Thrombozyten, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG₁) vorbehandelt wurden.

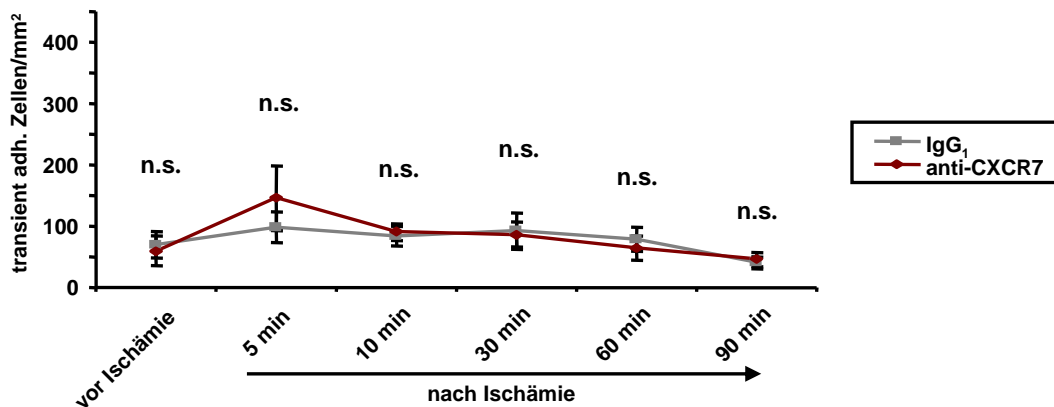


Abb. 51: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR7: n=6; IgG₁: n=6). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

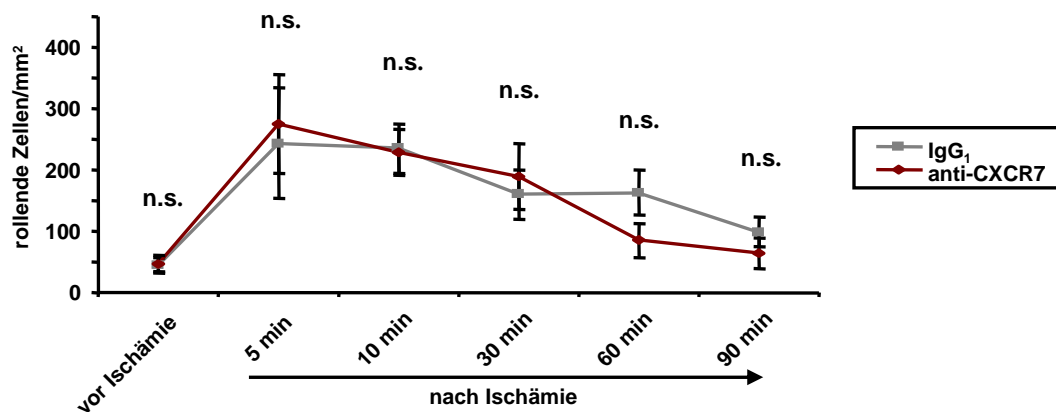


Abb. 52: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR7: $n=6$; IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

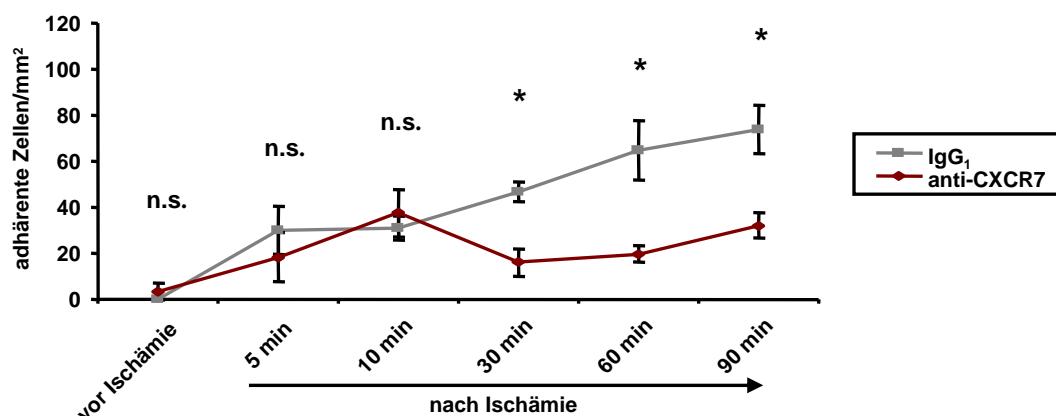


Abb. 53: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR7: $n=6$; IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

In der mit anti-CXCR7 vorinkubierten Gruppe, sowie in der Gruppe mit der Isotypkontrolle, ist der Anteil der Thrombozyten, die eine transient adhärenente Interaktion mit der Gefäßwand eingehen, annähernd gleich hoch (transient adhärenente Thrombozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[59,7 \pm 23,5 \text{ (SEM)}; 145,8 \pm 52,4; 90,2 \pm 13,9; 86,5 \pm 20,4; 64,5 \pm 19,9; 45,6 \pm 11,3]$ versus transient adhärenente Thrombozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[69,5 \pm 20,8; 98,3 \pm 24,8; 84,1 \pm 16,4; 92,2 \pm 29,8; 78,8 \pm 19,5; 40,3 \pm 10,1]$).

Auch bei den rollen Thrombozyten kommen in beiden Gruppen nahezu gleich große Anteil an Zellen vor (rollende Thrombozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[46,9 \pm 13,0 \text{ (SEM)}; 275,1 \pm 80,5; 229,1 \pm 37,2; 188,8 \pm 53,3; 85,2 \pm 28,1; 64,6 \pm 25,1]$ versus rollende Thrombozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min;

10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[44,4 \pm 12,9; 243,7 \pm 90,4; 234,9 \pm 39,6; 160,4 \pm 40,4; 163,2 \pm 36,3; 99,1 \pm 24,1]$).

Die beiden Gruppen unterscheiden sich in der Anzahl der adhärenenten Thrombozyten, wobei der Anteil an adhärenenten Zellen in der mit anti-CXCR7 vorinkubierten Gruppe zu drei Zeitpunkten nach Ischämie geringer ist (adhärenente Thrombozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[3,5 \pm 3,5 \text{ (SEM)}; 18,3 \pm 10,7; 37,4 \pm 10,1; 16,0 \pm 6,0; 19,5 \pm 3,6; 32,1 \pm 5,3]$ versus adhärenente Thrombozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0; 29,9 \pm 10,6; 31,0 \pm 5,3; 46,7 \pm 4,3; 64,9 \pm 13,0; 73,7 \pm 10,6]$).

Insgesamt betrachtet, sind die Anteile an transient adhärenenten und rollenden Thrombozyten in beiden Gruppen nahezu gleich hoch, während bei den adhärenenten Thrombozyten in der Reperusionsphase zum 30, 60 und 90 Minuten Zeitpunkt eine signifikant geringere Anzahl an anti-CXCR7 behandelten Zellen vorkommt.

3.3.3.2.4 Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten Thrombozyten mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen

Nachfolgende Schaubilder (Abb. 54, 55 und 56) zeigen die Verteilung der mit anti-CXCR7 vorbehandelten Gruppe in den Arteriolen verglichen mit der Gruppe der Thrombozyten, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG₁) vorinkubiert wurden.

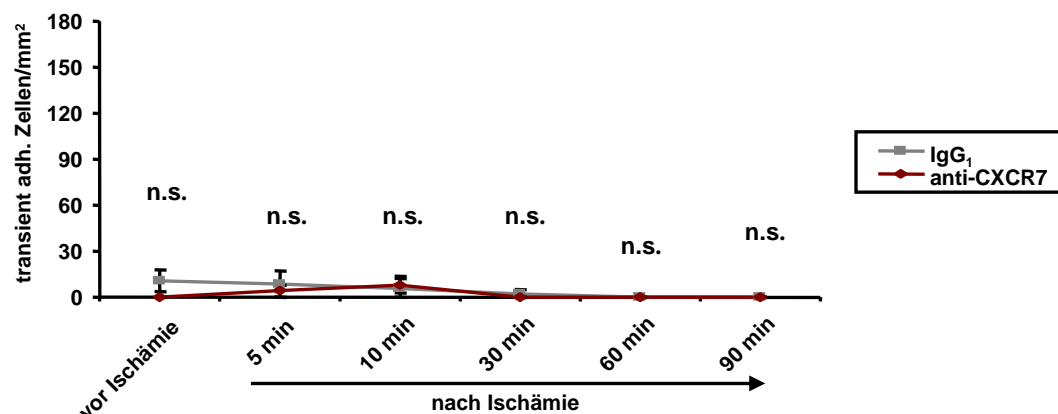


Abb. 54: Anzahl transient adhärenenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR7: n=6; IgG₁: n=6). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

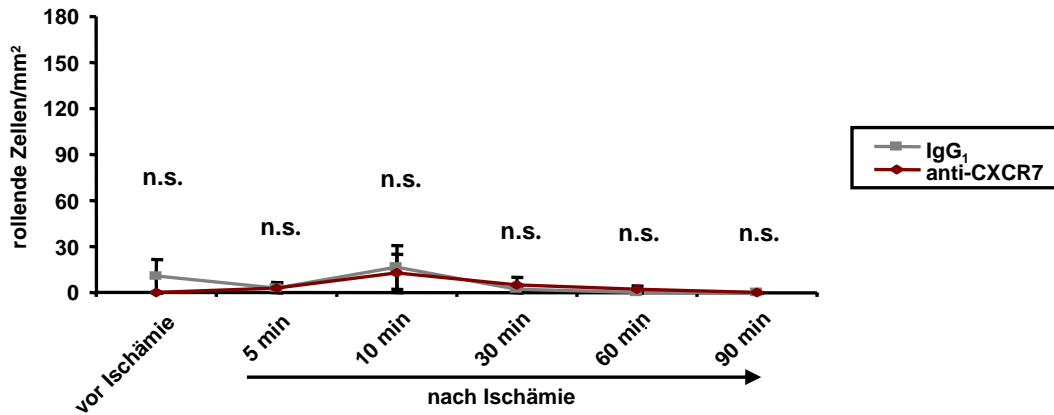


Abb. 55: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR7: $n=6$; IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

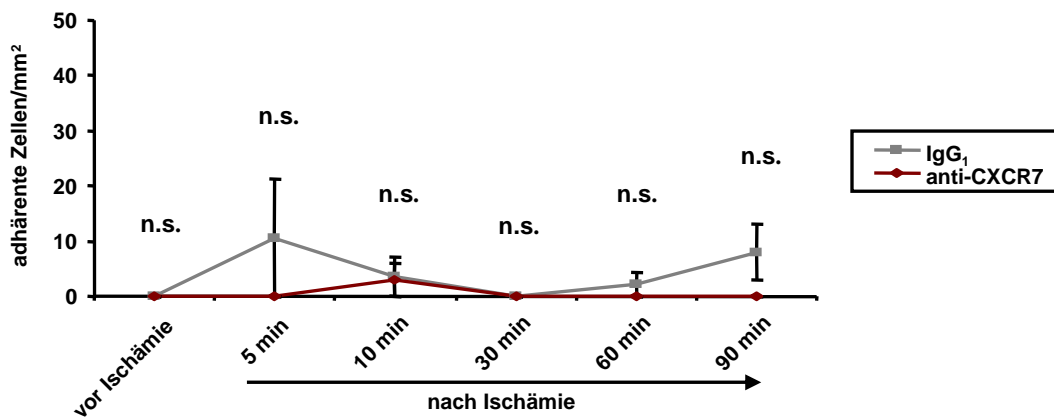


Abb. 56: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR7: $n=6$; IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

Die Anzahl an transient adhärenenten Thrombozyten ist in beiden Gruppen vergleichbar gering (transient adhärenente Thrombozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0 \text{ (SEM)}; 4,0 \pm 4,0; 8,2 \pm 5,3; 0 \pm 0; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$ versus transient adhärenente Thrombozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[10,6 \pm 7,2; 8,5 \pm 8,5; 5,9 \pm 5,9; 2,4 \pm 2,4; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$).

Es kommt eine ähnliche Anzahl an rollenden Thrombozyten in beiden Gruppen vor (rollende Thrombozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0 \text{ (SEM)}; 3,1 \pm 3,1; 12,6 \pm 12,6; 5,0 \pm 5,0; 2,0 \pm 2,0; 0 \pm 0]$ versus rollende Thrombozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[10,6 \pm 10,6; 3,1 \pm 3,1; 16,5 \pm 14,3; 2,0 \pm 2,0; 0 \pm 0; 0 \pm 0]$).

Bei den Thrombozyten, die eine adhärente Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, fällt der Anteil in der Gruppe mit der Isotypkontrolle etwas höher aus (adhärente Thrombozyten mit anti-CXCR7 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0,000 \pm 0,000 \text{ (SEM)}; 0,000 \pm 0,000; 2,947 \pm 2,947; 0,000 \pm 0,000; 0,000 \pm 0,000; 0,000 \pm 0,000]$ versus adhärente Thrombozyten mit IgG₁ [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0,000 \pm 0,000; 10,610 \pm 10,610; 3,537 \pm 3,537; 0,000 \pm 0,000; 2,210 \pm 2,210; 7,958 \pm 5,079]$).

Die geringfügig voneinander abweichenden Ergebnisse in beiden Gruppen zeigen zu keinem Zeitpunkt nach Ischämie signifikante Unterschiede.

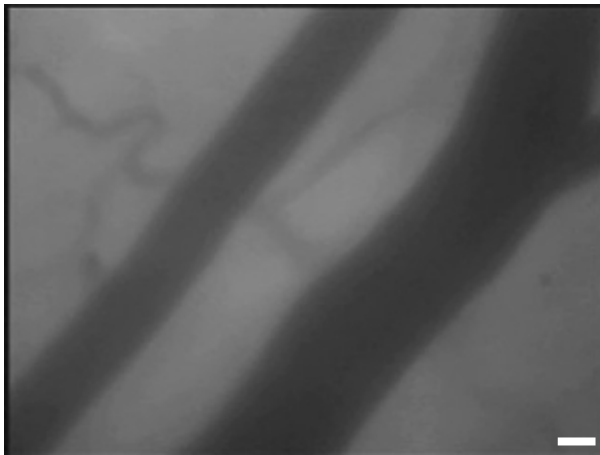


Abb. 57.1: Thrombozyten mit anti-CXCR7 vor Ischämie.

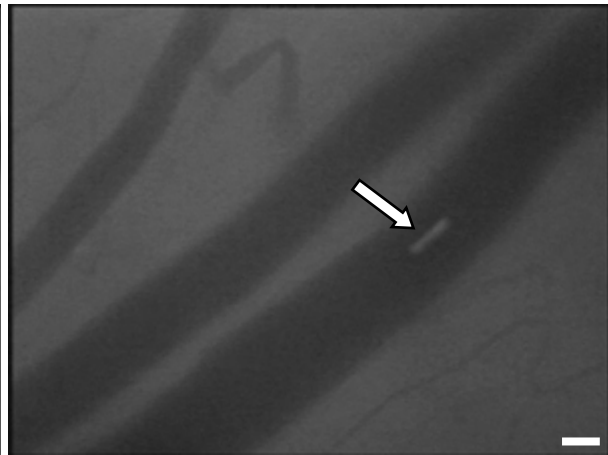


Abb. 57.2: Thrombozyten mit IgG₁ vor Ischämie.

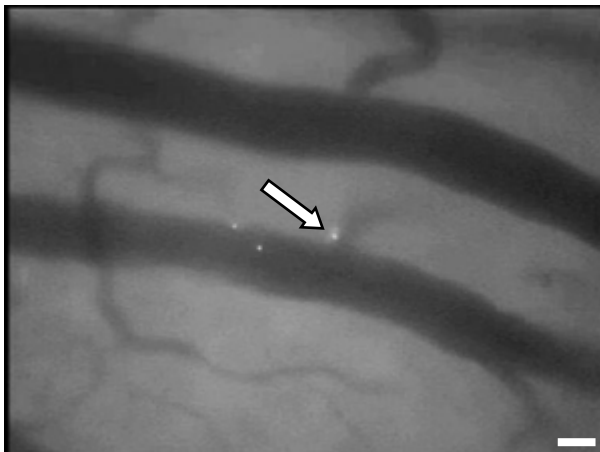


Abb. 57.3: Thrombozyten mit anti-CXCR7 30 Minuten nach Ischämie .

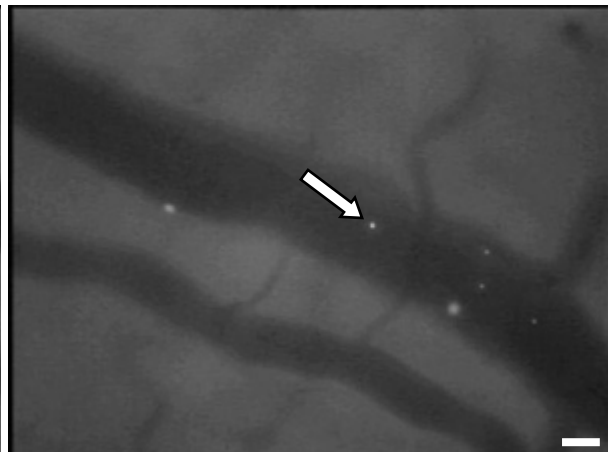


Abb. 57.4: Thrombozyten mit IgG₁ 30 Minuten nach Ischämie.

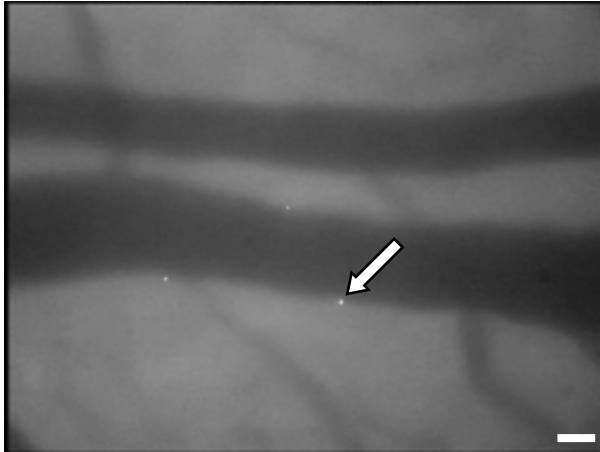


Abb. 57.5: Thrombozyten mit anti-CXCR7
60 Minuten nach Ischämie.

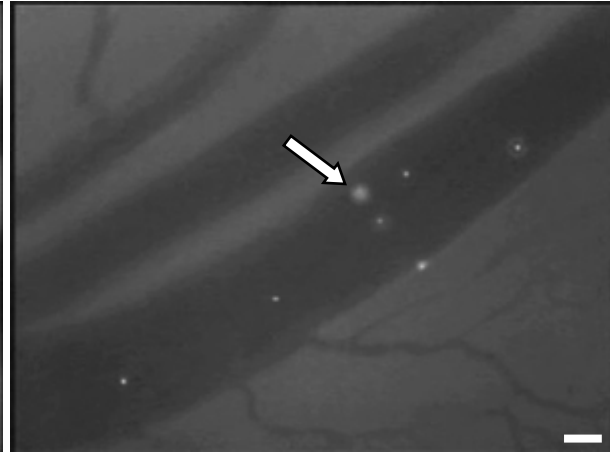


Abb. 57.6: Thrombozyten mit IgG₁
60 Minuten nach Ischämie.

3.3.4 Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen hämatopoetischen CD34⁺ Stammzellen

3.3.4.1 Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen CD34⁺ Zellen im ligaturinduzierten Verletzungsmodell der Arteria carotis communis

3.3.4.1.1 Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten CD34⁺ Zellen mit der Isotypkontrolle

In den nachfolgenden Schaubildern (Abb. 58 und 59) ist die Verteilung der mit dem Antikörper anti-CXCR4 vorinkubierten humanen CD34⁺ Zellen im Vergleich zu CD34⁺ Zellen, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG_{2B}) vorbehandelt wurden, dargestellt.

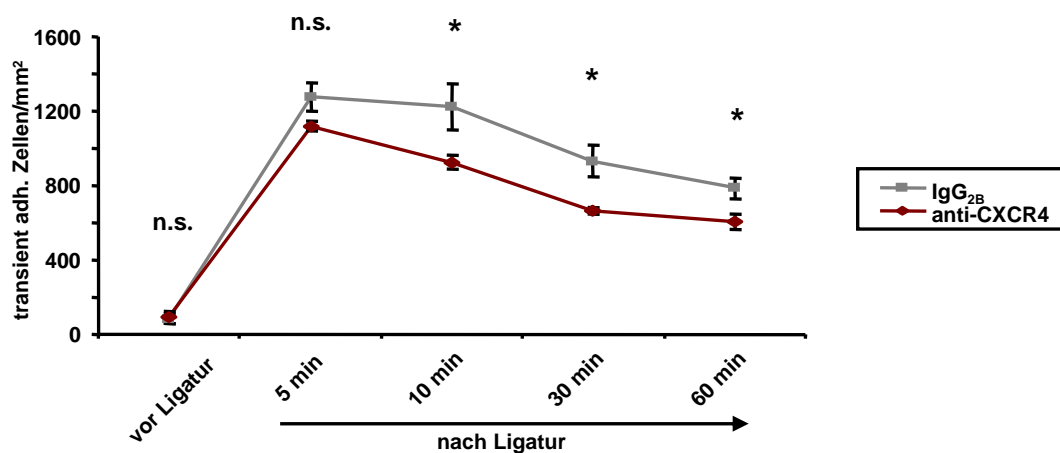


Abb. 58: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR4: n=6; IgG_{2B}: n=6). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

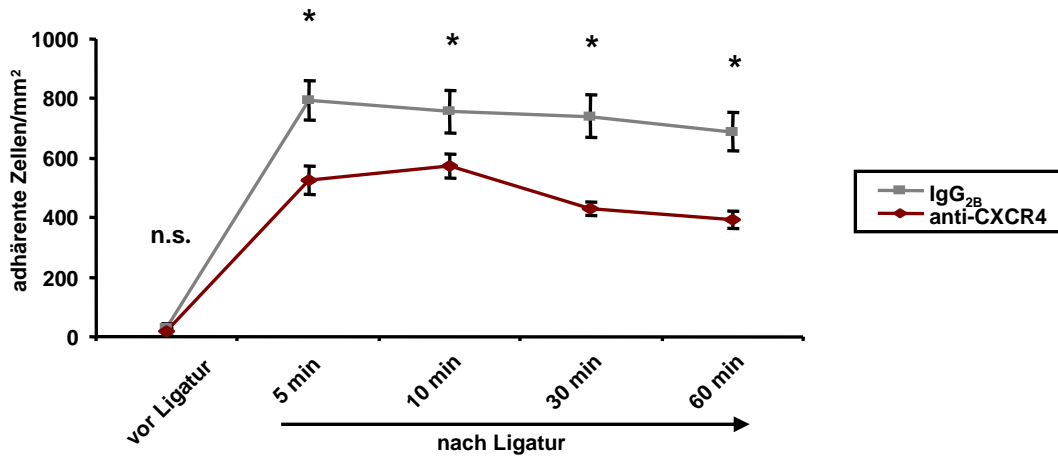


Abb. 59: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR4: $n=6$; IgG_{2B}: $n=6$).
* $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

Der Anteil der transient adhärenter Zellen ist in der Gruppe der $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 geringer als bei den $CD34^+$ Zellen mit der Isotypkontrolle (transient adhärenter $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[91,3 \pm 33,6$ (SEM); $1119,2 \pm 27,0$; $926,3 \pm 37,6$; $663,9 \pm 15,6$; $607,9 \pm 40,9$] versus transient adhärenter $CD34^+$ Zellen mit IgG_{2B} [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[84,4 \pm 27,8$; $1278,9 \pm 76,7$; $1222,7 \pm 125,1$; $930,7 \pm 85,2$; $786,1 \pm 55,0$]).

Verglichen mit der Kontrollgruppe fällt auch die Anzahl an adhärenter $CD34^+$ Zellen in der Gruppe mit den anti-CXCR4 vorbehandelten Zellen geringer aus (adhärenter $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[17,3 \pm 12,2$ (SEM); $525,1 \pm 47,1$; $573,2 \pm 39,0$; $430,4 \pm 22,7$; $393,8 \pm 30,6$] versus adhärenter $CD34^+$ Zellen mit IgG_{2B} [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[30,7 \pm 13,0$; $793,3 \pm 66,0$; $755,8 \pm 71,4$; $740,6 \pm 73,2$; $688,7 \pm 65,5$]).

Die Kurven in den Schaubildern mit der Verteilung der transient adhärenter und adhärenter $CD34^+$ Zellen zeigen, dass die Anzahl der mit anti-CXCR4 vorbehandelten $CD34^+$ Zellen bei fast allen Zeitpunkten nach Lösen der Ligatur signifikant geringer ist als bei den mit IgG_{2B} vorinkubierten $CD34^+$ Zellen.



Abb. 60.1: $CD34^{+}$ Zellen mit anti-CXCR4 vor Ligatur.



Abb. 60.2: $CD34^{+}$ Zellen mit IgG_{2B} vor Ligatur.

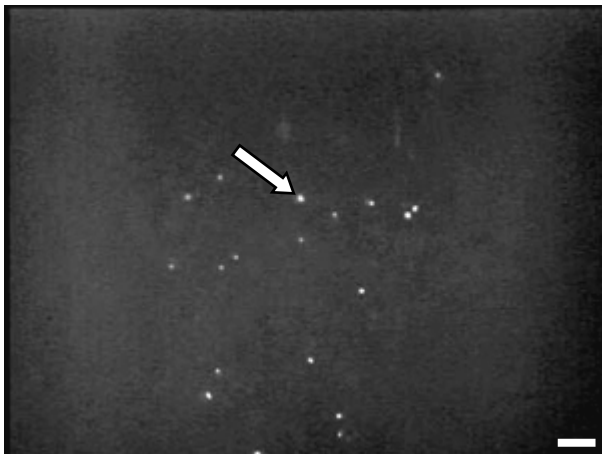


Abb. 60.3: $CD34^{+}$ Zellen mit anti-CXCR4 10 Minuten nach Ligatur.

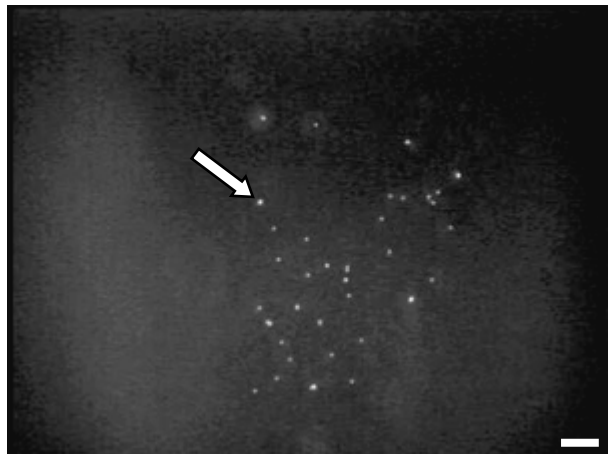


Abb. 60.4: $CD34^{+}$ Zellen mit IgG_{2B} 10 Minuten nach Ligatur.

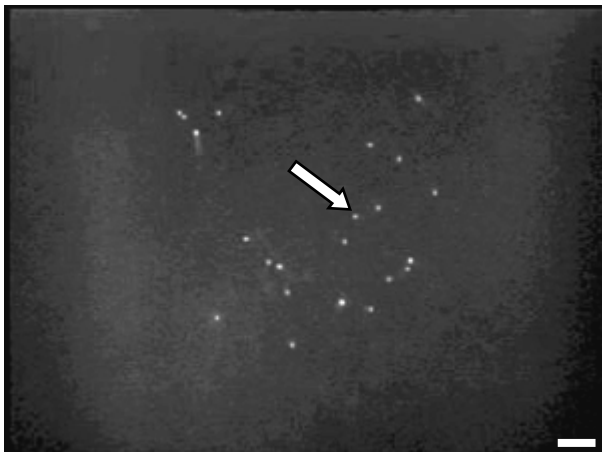


Abb. 60.5: $CD34^{+}$ Zellen mit anti-CXCR4 30 Minuten nach Ligatur.

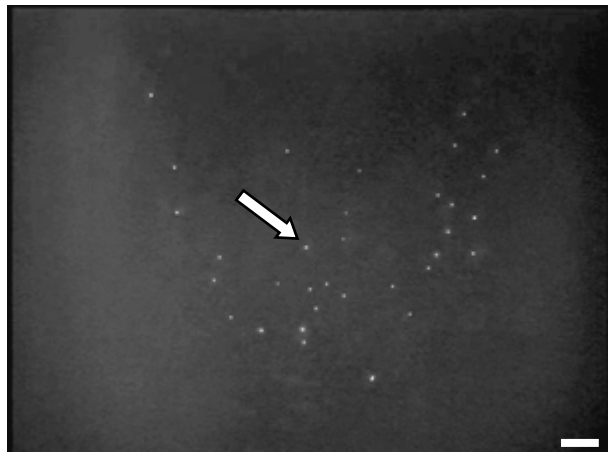


Abb. 60.6: $CD34^{+}$ Zellen mit IgG_{2B} 30 Minuten nach Ligatur.

3.3.4.1.2 Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten CD34⁺ Zellen mit der Isotypkontrolle

In den nachfolgenden Schaubildern (Abb. 61 und 62) wird die Verteilung der Gruppe der CD34⁺ Zellen gezeigt, die mit dem blockierenden Antikörper anti-CXCR7 vorinkubiert wurden im Vergleich zu den CD34⁺ Zellen, die mit der Isotypkontrolle (IgG₁) vorbehandelt worden sind.

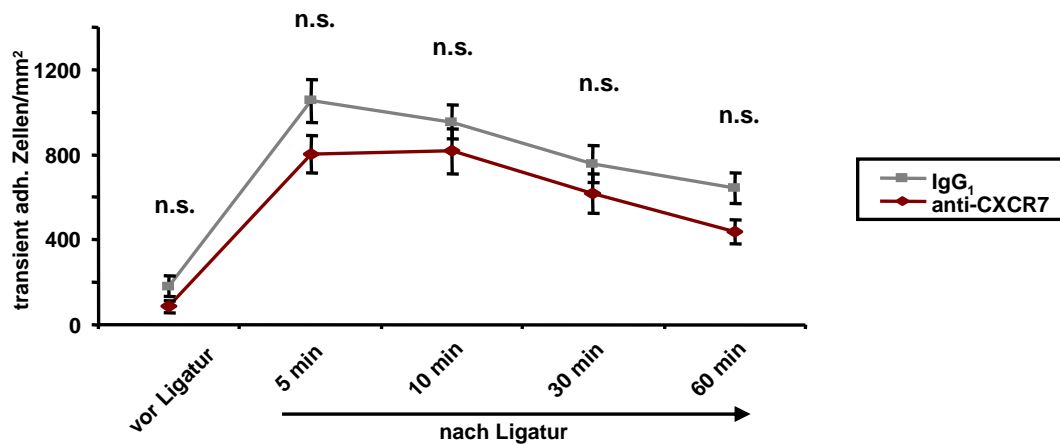


Abb. 61: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR7: n=8; IgG₁: n=8). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

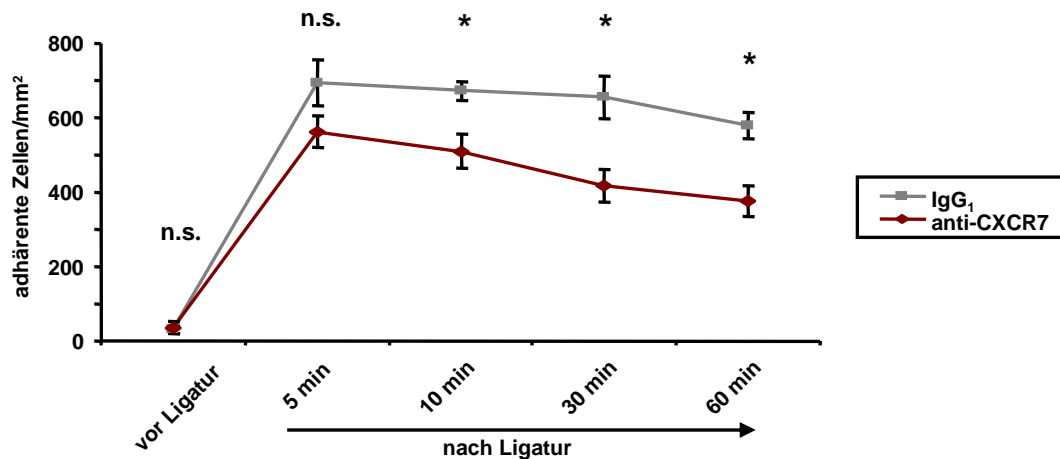


Abb. 62: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell (anti-CXCR7: n=8; IgG₁: n=8). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

Sowohl in der Gruppe der CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR7, als auch in der Gruppe mit der Isotypkontrolle ist eine annähernd gleiche Anzahl an transient adhärenen Zellen festzustellen (transient adhärenere CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60

min nach Ligatur]: $[85,3 \pm 29,9 \text{ (SEM)}; 802,8 \pm 88,4; 816,7 \pm 105,7; 618,0 \pm 90,5; 437,5 \pm 56,4]$ versus transient adhärente CD34^+ Zellen mit IgG_1 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[182,0 \pm 48,7; 1053,9 \pm 101,0; 954,4 \pm 78,1; 757,1 \pm 86,3; 644,2 \pm 72,8]$).

Ein Unterschied ergibt sich bei der Betrachtung der adhärenten CD34^+ Zellen, deren Anzahl in der mit anti-CXCR7 vorbehandelten Gruppe geringer ausf llt (adhärente CD34^+ Zellen mit anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[36,2 \pm 16,7 \text{ (SEM)}; 562,9 \pm 41,5; 509,0 \pm 45,4; 417,8 \pm 44,1; 376,9 \pm 40,4]$ versus adhärente CD34^+ Zellen mit IgG_1 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[31,8 \pm 9,9; 694,0 \pm 60,5; 672,3 \pm 23,8; 655,2 \pm 57,9; 578,9 \pm 35,5]$).

Im Schaubild der transient adhärenten als auch der adhärenten CD34^+ Zellen ist der Anteil der mit anti-CXCR7 vorinkubierten Zellen stets geringer als in der Gruppe der CD34^+ Zellen mit der Isotypkontrolle. Bei den mit anti-CXCR7 vorbehandelten CD34^+ Zellen liegt dabei bis auf den 5 Minuten Zeitpunkt zu allen Zeitpunkten nach Lösen der Ligatur eine signifikant geringere Anzahl an adhärenten Zellen vor als in der Gruppe mit der Isotypkontrolle.



Abb. 63.1: CD34^+ Zellen mit anti-CXCR7 vor Ligatur.

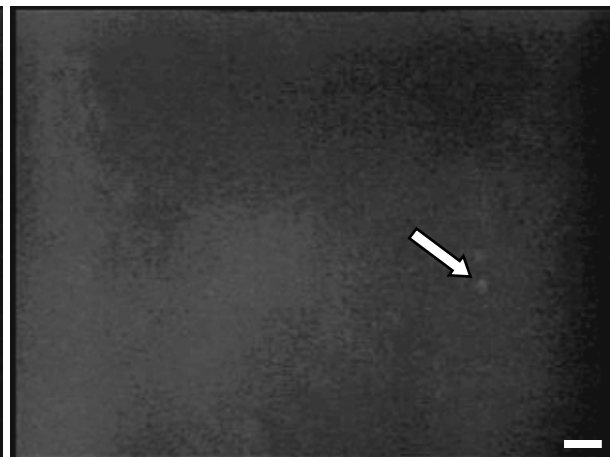


Abb. 63.2: CD34^+ Zellen mit IgG_1 vor Ligatur.

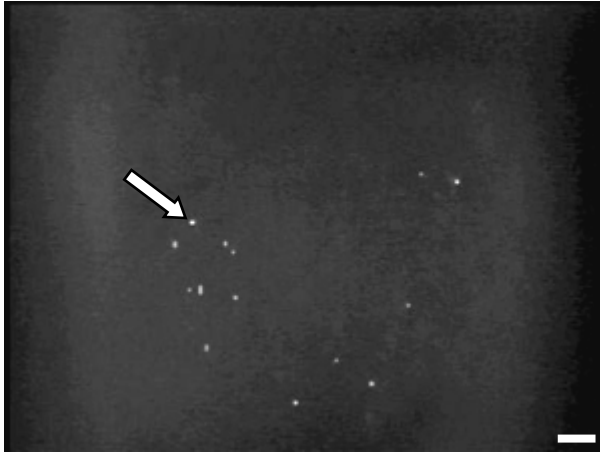


Abb. 63.3: $CD34^{+}$ Zellen mit anti-CXCR7
10 Minuten nach Ligatur.

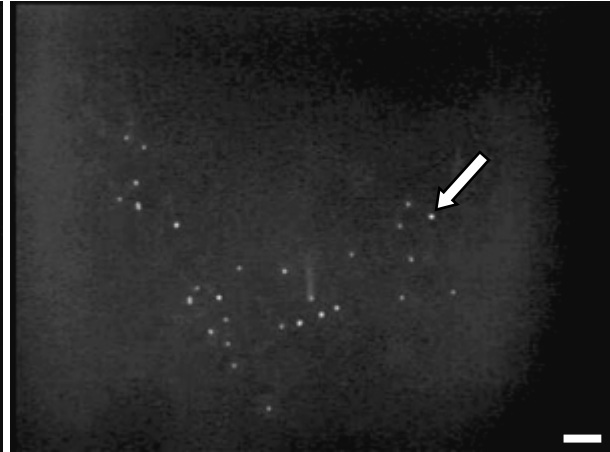


Abb. 63.4: $CD34^{+}$ Zellen mit IgG_1
10 Minuten nach Ligatur.

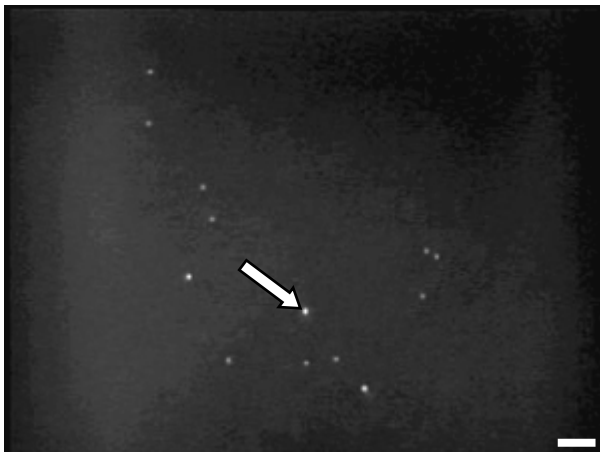


Abb. 63.5: $CD34^{+}$ Zellen mit anti-CXCR7
30 Minuten nach Ligatur.

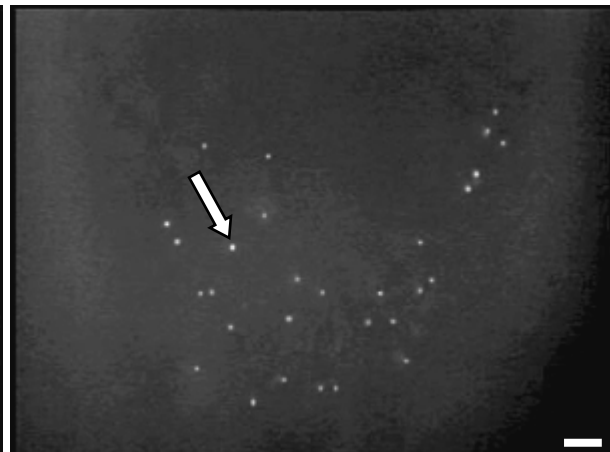


Abb. 63.6: $CD34^{+}$ Zellen mit IgG_1
30 Minuten nach Ligatur.

3.3.4.1.3 Vergleich von anti-CXCR4 und anti-CXCR7 vorbehandelten $CD34^{+}$ mit den Isotypkontrollen

Die folgenden Schaubilder (Abb. 64 und 65) zeigen die Verteilung der $CD34^{+}$ Zellen, die mit beiden blockierenden Antikörpern (anti-CXCR4 und anti-CXCR7) vorinkubiert wurden im Vergleich zu der Gruppe der $CD34^{+}$ Zellen, die mit der Kombination aus den entsprechenden Isotypkontrollen (IgG_{2B} und IgG_1) vorbehandelt worden sind.

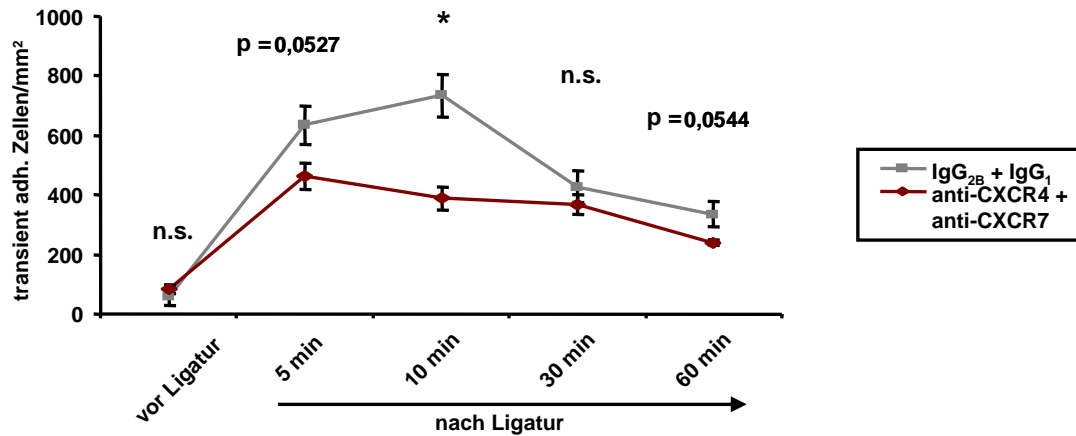


Abb. 64: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Zellen mit der Kombination aus anti-CXCR4 und anti-CXCR7 beziehungsweise der Kombination aus den Isotypkontrollen im Carotismodell (anti-CXCR4 und anti-CXCR7: $n=6$; IgG_{2B} und IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

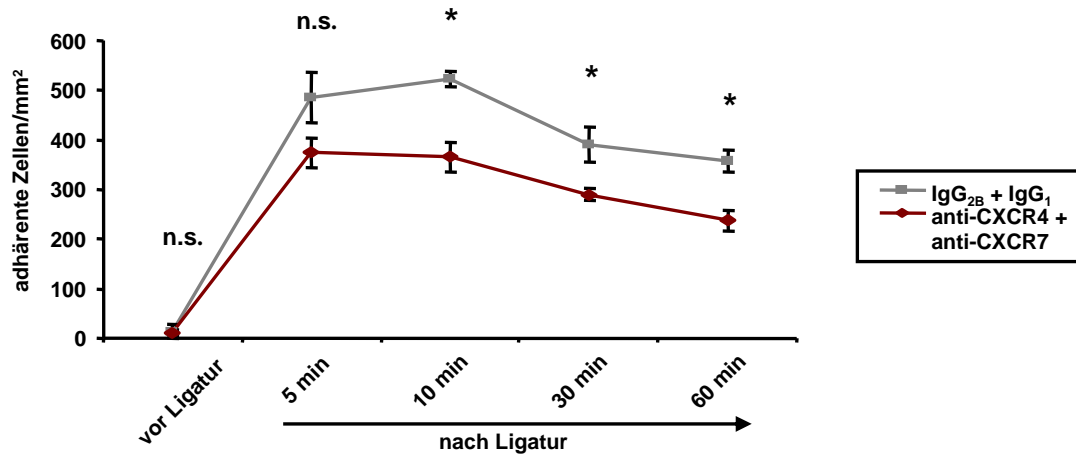


Abb. 65: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Zellen mit der Kombination aus anti-CXCR4 und anti-CXCR7 beziehungsweise der Kombination aus den Isotypkontrollen im Carotismodell (anti-CXCR4 und anti-CXCR7: $n=6$; IgG_{2B} und IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

Die beiden Gruppen unterscheiden sich in der Anzahl der transient adhärenen $CD34^+$ Zellen. Diese sind bei Vorinkubation mit anti-CXCR4 und anti-CXCR7 weniger vertreten (transient adhärenente $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 und anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[84,1 \pm 14,6 \text{ (SEM)}; 463,8 \pm 44,9; 388,5 \pm 37,9; 368,2 \pm 32,7; 240,5 \pm 10,6]$ versus transient adhärenente $CD34^+$ Zellen mit IgG_{2B} und IgG₁ [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: $[57,9 \pm 28,3; 635,8 \pm 64,1; 734,2 \pm 71,3; 427,7 \pm 53,7; 335,4 \pm 42,3]$).

Auch die Anzahl adhärenter $CD34^+$ Zellen fällt in der Gruppe der mit anti-CXCR4 und anti-CXCR4 vorinkubierten Zellen geringer aus (adhärenente $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 und

anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: [$11,6 \pm 5,8$ (SEM); $374,5 \pm 29,7$; $365,1 \pm 29,2$; $289,7 \pm 12,4$; $237,7 \pm 21,1$] versus adhärente CD34⁺ Zellen mit IgG_{2B} und IgG₁ [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: [$14,3 \pm 14,3$; $485,0 \pm 51,2$; $522,9 \pm 15,2$; $390,1 \pm 35,8$; $357,4 \pm 22,1$]).

Zu allen Zeitpunkten nach Lösen der Ligatur kommen am verletzten Endothel in der mit beiden Antikörpern vorbehandelten Gruppe weniger transient adhärente und adhärente CD34⁺ Zellen vor als in der Kontrollgruppe. Hierbei ergeben sich bei den adhärenten CD34⁺ Zellen, mit Ausnahme des 5 Minuten Zeitpunktes, signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen.



Abb. 66.1: CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR4+7 vor Ligatur.

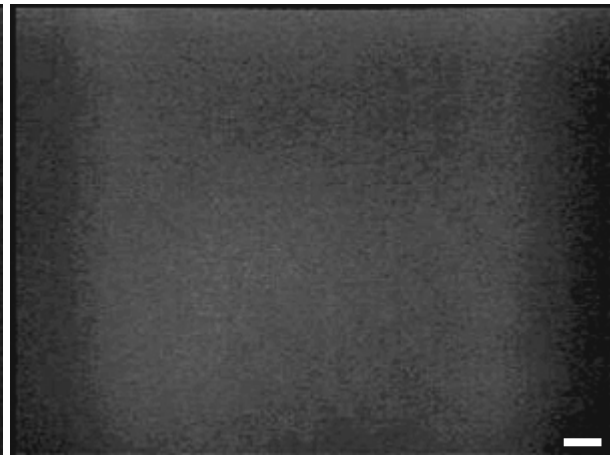


Abb. 66.2: CD34⁺ Zellen mit IgG_{2B}+IgG₁ vor Ligatur.

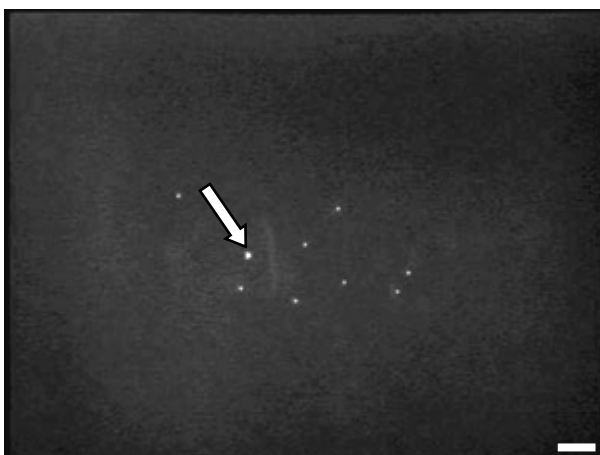


Abb. 66.3: CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR4+7 10 Minuten nach Ligatur.

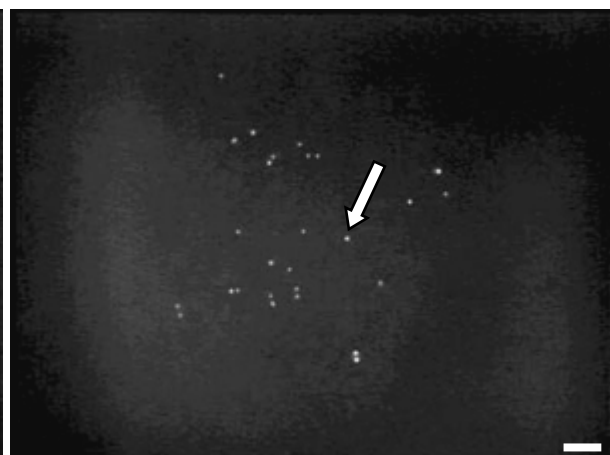


Abb. 66.4: CD34⁺ Zellen mit IgG_{2B}+IgG₁ 10 Minuten nach Ligatur.

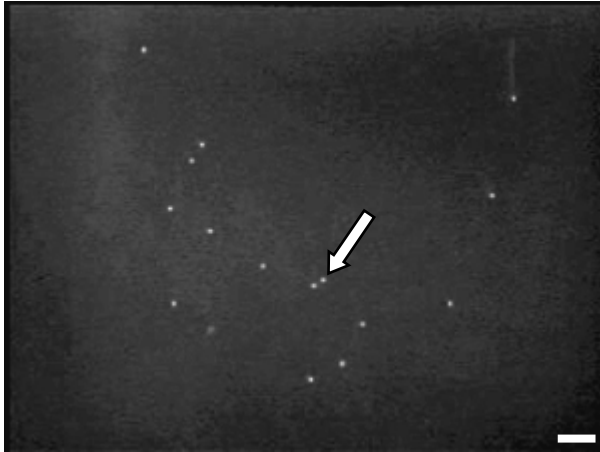


Abb. 66.5: $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4+7 30 Minuten nach Ligatur.

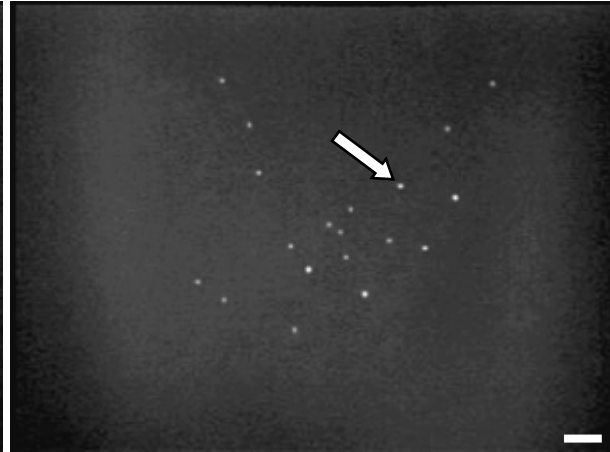


Abb. 66.6: $CD34^+$ Zellen mit $IgG_{2B}+IgG_1$ 30 Minuten nach Ligatur.

3.3.4.2 Intravitalmikroskopische Untersuchungen mit humanen hämatopoetischen $CD34^+$ Stammzellen im Ischämie-Reperusionsmodell des Dünndarms

3.3.4.2.1 Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten $CD34^+$ Zellen mit der Isotypkontrolle in den Venolen

In den nachfolgenden Schaubildern (Abb. 67, 68 und 69) ist die Verteilung der Gruppe der $CD34^+$ Zellen in den Venolen dargestellt, die mit dem Antikörper anti-CXCR4 vorinkubiert wurden im Vergleich zu den $CD34^+$ Zellen, die mit der Isotypkontrolle (IgG_{2B}) vorbehandelt worden sind.

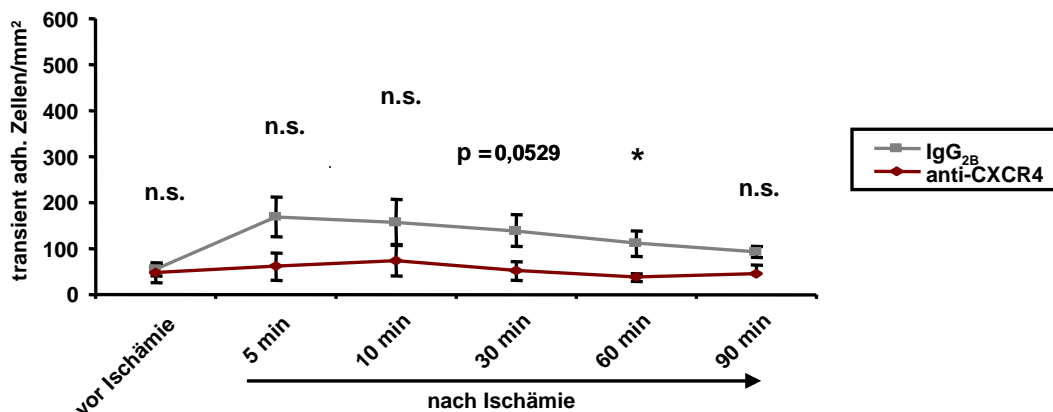


Abb. 67: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR4: n=7; IgG_{2B} : n=7). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

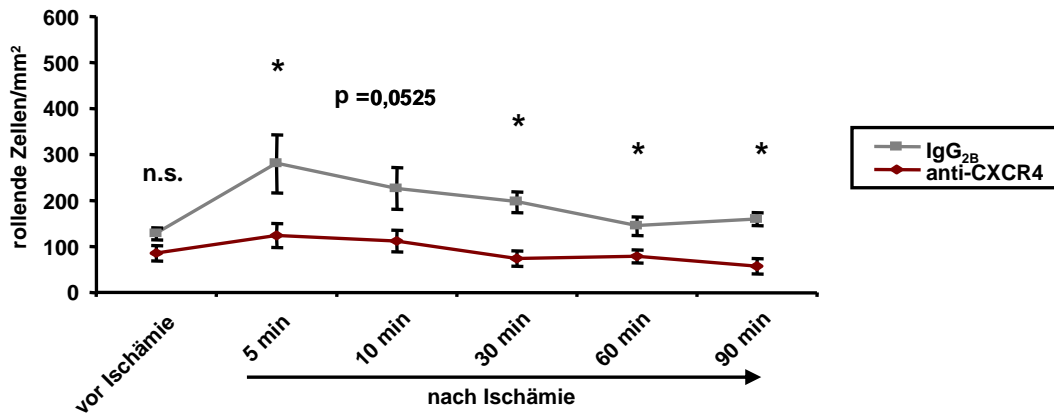


Abb. 68: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR4: $n=7$; IgG_{2B}: $n=7$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

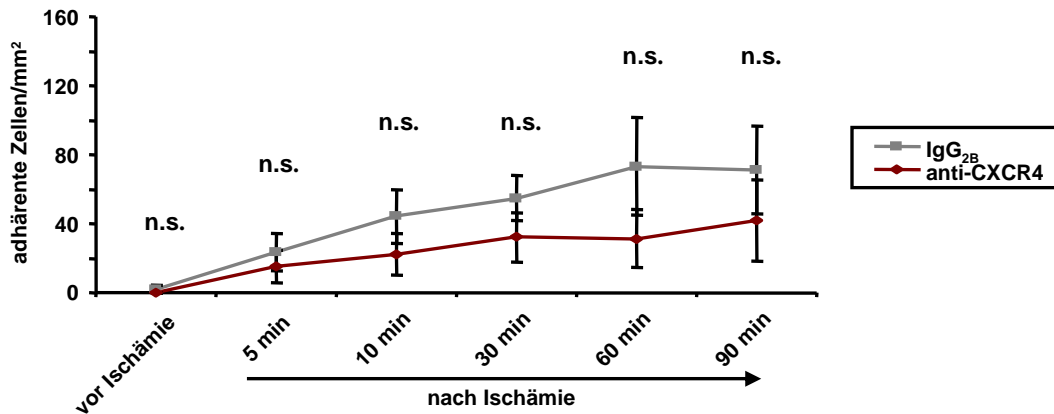


Abb. 69: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR4: $n=7$; IgG_{2B}: $n=7$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen kommt bei den transient adhärenen $CD34^+$ Zellen zustande, deren Anzahl in der mit anti-CXCR4 vorbehandelten Gruppe geringer ausfällt (transient adhärenente $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[48,4 \pm 21,7$ (SEM); $61,2 \pm 29,3$; $74,6 \pm 33,8$; $51,7 \pm 20,7$; $37,2 \pm 8,9$; $46,0 \pm 18,1]$ versus transient adhärenente $CD34^+$ Zellen mit IgG_{2B} [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[55,2 \pm 13,9$; $169,0 \pm 43,0$; $156,5 \pm 50,3$; $138,8 \pm 33,9$; $111,6 \pm 27,3$; $92,5 \pm 12,4]$).

Auch die rollenden $CD34^+$ Zellen treten verglichen mit der Kontrollgruppe in der Gruppe mit den anti-CXCR4 vorbehandelten Zellen weniger auf (rollende $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[86,1 \pm 17,0$ (SEM); $124,6 \pm 25,9$; $112,8 \pm 23,8$; $73,6 \pm 17,2$; $78,0 \pm 14,3$; $57,1 \pm 16,7]$ versus rollende $CD34^+$

Zellen mit IgG_{2B} [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [128,1 ± 12,676; 280,0 ± 63,5; 226,5 ± 45,9; 197,1 ± 22,9; 144,1 ± 19,7; 158,8 ± 13,9]).

Der Anteil an adhärenenten Zellen ist in der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Gruppe geringer als in der Gruppe der Zellen mit der Isotypkontrolle (adhärente CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [0 ± 0 (SEM); 15,3 ± 9,4; 22,3 ± 12,2; 32,1 ± 14,5; 31,2 ± 16,8; 41,9 ± 23,2] versus adhärenente CD34⁺ Zellen mit IgG_{2B} [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [2,1 ± 2,1; 23,5 ± 10,6; 44,4 ± 15,6; 54,9 ± 12,9; 73,3 ± 28,0; 71,0 ± 25,4]).

Bei allen drei Interaktionstypen kommen jeweils weniger CD34⁺ Zellen in der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Gruppe vor, wobei bei der Interaktionsart der transient adhärenenten CD34⁺ Zellen zum 60 min Zeitpunkt nach Ischämie und bei den rollenden Zellen zu den Zeitpunkten 5, 30, 60 und 90 min nach Ischämie signifikant geringere Zellzahlen auftreten. Im Gegensatz dazu sind bei einem Vergleich der adhärenenten Zellen keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

3.3.4.2.2 Vergleich von anti-CXCR4 vorbehandelten CD34⁺ Zellen mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen

In den folgenden Darstellungen (Abb. 70, 71 und 72) ist die Verteilung der CD34⁺ Zellen in den Arteriolen veranschaulicht, die in der einen Gruppe mit anti-CXCR4 vorinkubiert wurden und in der Vergleichsgruppe mit der dazugehörigen Isotypkontrolle (IgG_{2B}).

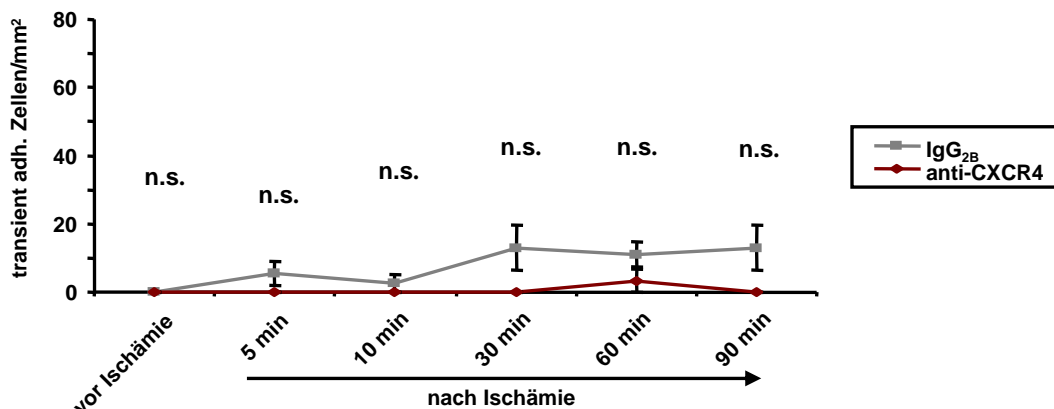


Abb. 70: Anzahl transient adhärenenter Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR4: n=7; IgG_{2B}: n=7). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

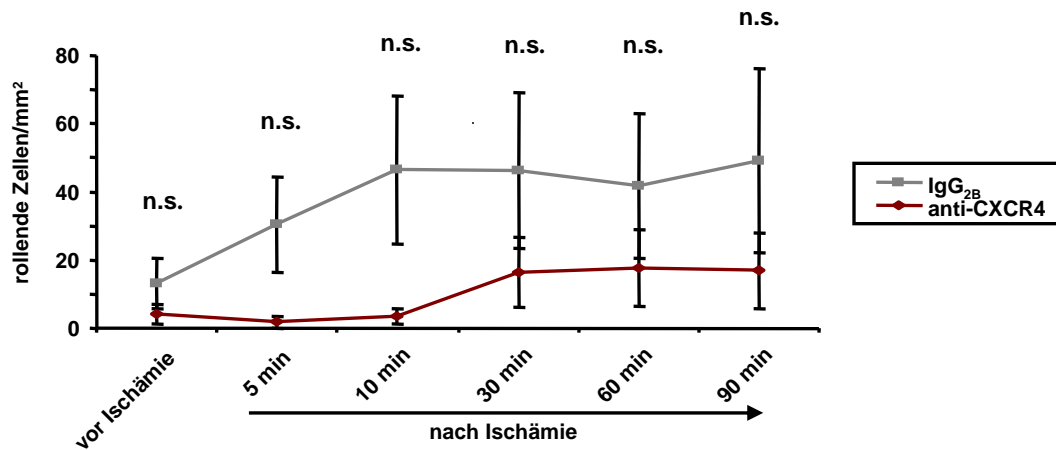


Abb. 71: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR4: $n=7$; IgG_{2B}: $n=7$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

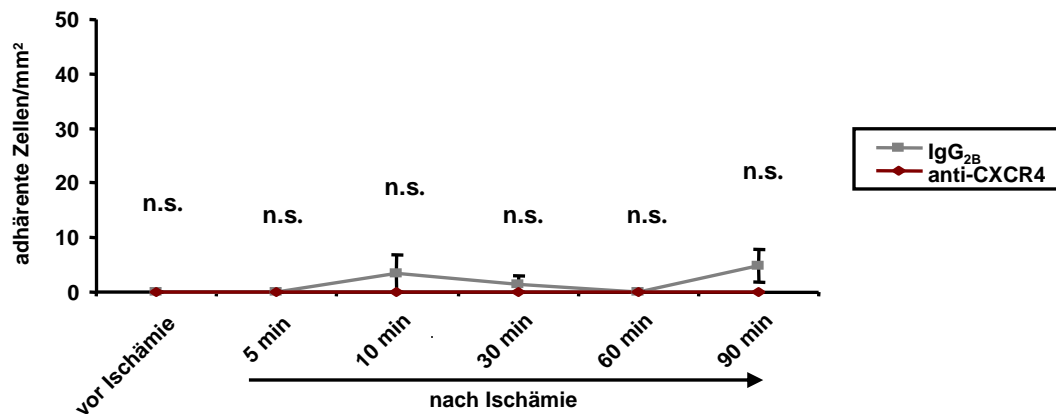


Abb. 72: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR4: $n=7$; IgG_{2B}: $n=7$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

Der Anteil an transient adhärenenten $CD34^+$ Zellen ist in der mit der Isotypkontrolle vorbehandelten Gruppe etwas höher, während in der Gruppe mit anti-CXCR4 kaum transient adhärenente Zellen auftreten (transient adhärenente $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0$ (SEM); 0 ± 0 ; 0 ± 0 ; 0 ± 0 ; $3,3 \pm 3,3$; 0 ± 0] versus transient adhärenente $CD34^+$ Zellen mit IgG_{2B} [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0$; $5,5 \pm 3,5$; $2,526 \pm 2,5$; $12,9 \pm 6,6$; $11,1 \pm 3,8$; $13,0 \pm 6,4$]).

Bei Betrachtung der rollenden $CD34^+$ Zellen kommen in der mit anti-CXCR4 vorinkubierten Gruppe weniger Roller vor als in der Kontrollgruppe (rollende $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[4,1 \pm 2,9$ (SEM); $1,8 \pm 1,8$; $3,4 \pm 2,2$; $16,3 \pm 10,3$; $17,8 \pm 11,3$; $16,9 \pm 11,1$] versus rollende $CD34^+$ Zellen mit IgG_{2B}

[vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [$13,1 \pm 7,3$; $30,4 \pm 14,0$; $46,4 \pm 21,7$; $46,2 \pm 22,9$; $41,8 \pm 21,1$; $49,2 \pm 27,0$]).

Während in der Gruppe mit dem blockierenden Antikörper anti-CXCR4 keine adhärenen Zellen auftreten, ist in der Kontrollgruppe ein geringer Anteil an adhärenen $CD34^+$ Zellen festzustellen (adhärente $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [0 ± 0 (SEM); 0 ± 0 ; 0 ± 0 ; 0 ± 0 ; 0 ± 0 ; 0 ± 0] versus adhärenen $CD34^+$ Zellen mit IgG_{2B} [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [0 ± 0 ; 0 ± 0 ; $3,4 \pm 3,4$; $1,5 \pm 1,5$; 0 ± 0 ; $4,7 \pm 3,0$]).

Es besteht die Tendenz, dass bei allen drei Interaktionstypen weniger mit anti-CXCR4 vorbehandelte $CD34^+$ Zellen auftreten. Dabei treten bei keinem der Zeitpunkte nach Ischämie signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

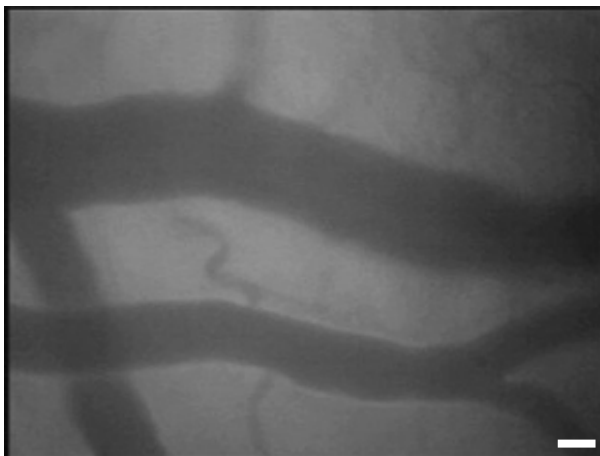


Abb. 73.1: $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 vor Ischämie.

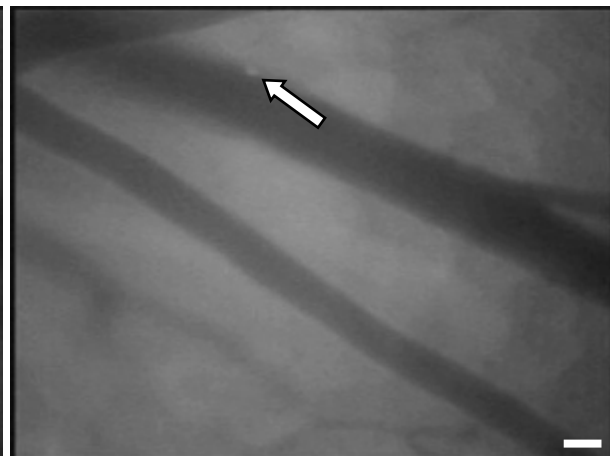


Abb. 73.2: $CD34^+$ Zellen mit IgG_{2B} vor Ischämie.

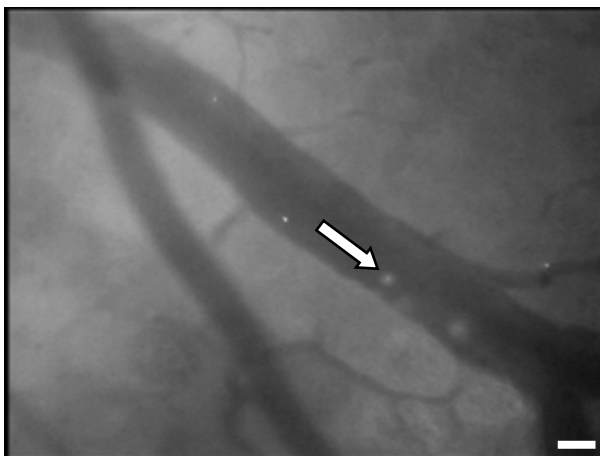


Abb. 73.3: $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4 30 Minuten nach Ischämie.

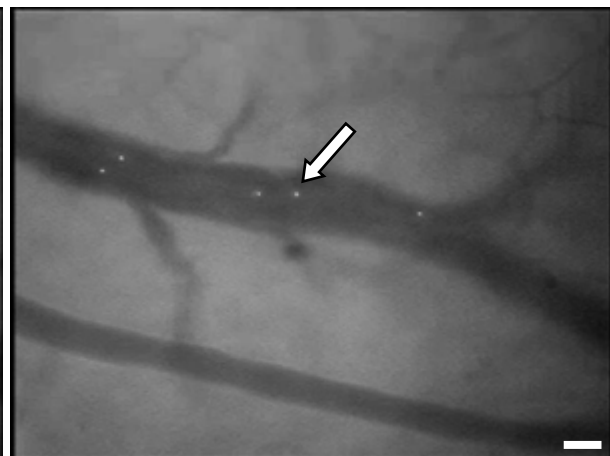


Abb. 73.4: $CD34^+$ Zellen mit IgG_{2B} 30 Minuten nach Ischämie.

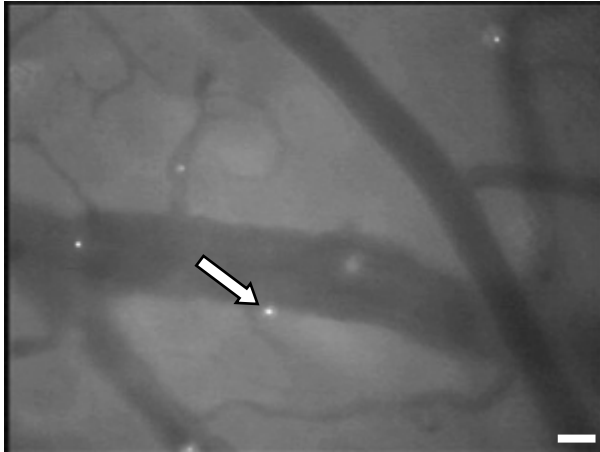


Abb. 73.5: $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR4
60 Minuten nach Ischämie.

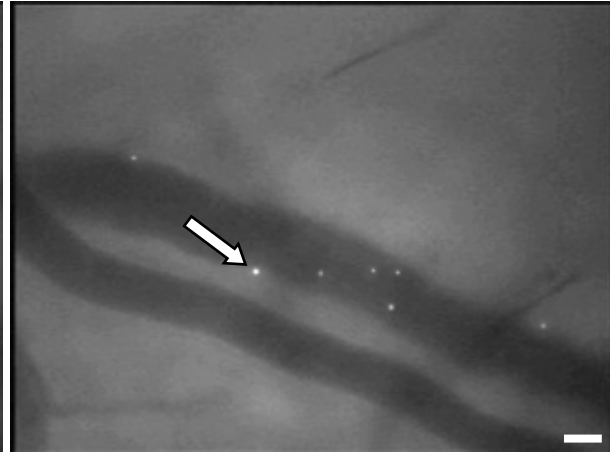


Abb. 73.6: $CD34^+$ Zellen mit IgG_{2B}
60 Minuten nach Ischämie.

3.3.4.2.3 Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten $CD34^+$ Zellen mit der Isotypkontrolle in den Venolen

In den folgenden Schaubildern (Abb. 74, 75 und 76) ist ein Vergleich der Verteilung von $CD34^+$ Zellen dargestellt, die entweder mit dem blockierenden Antikörper anti-CXCR7 oder der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG_1) vorinkubiert wurden.

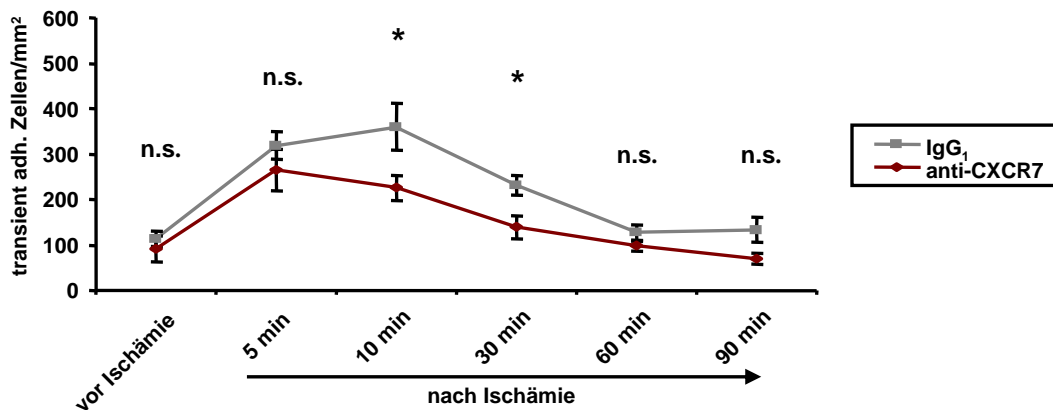


Abb. 74: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR7: $n=6$; IgG_1 : $n=6$). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

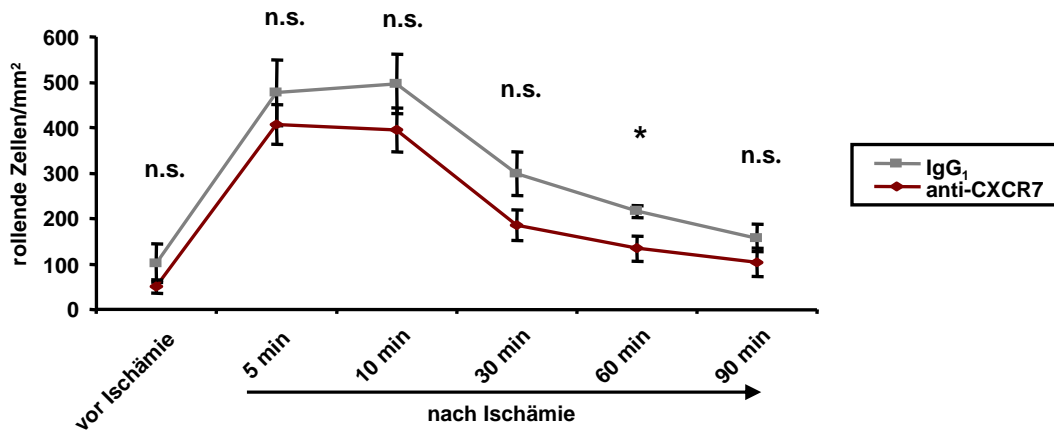


Abb. 75: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR7: n=6; IgG₁: n=6). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

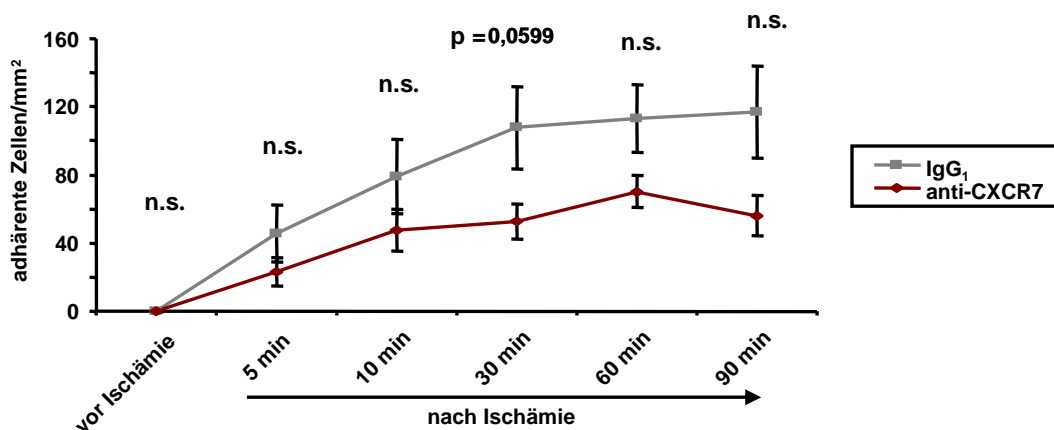


Abb. 76: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen) (anti-CXCR7: n=6; IgG₁: n=6). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

Bei Betrachtung der transient adhärenen CD34⁺ Zellen fällt auf, dass deren Anzahl in der mit anti-CXCR7 vorbehandelten Gruppe etwas geringer ausfällt (transient adhärenente CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [92,3 ± 28,7 (SEM); 264,5 ± 46,1; 225,9 ± 27,5; 138,7 ± 25,4; 99,4 ± 12,3; 70,7 ± 12,2] versus transient adhärenente CD34⁺ Zellen mit IgG₁ [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [114,1 ± 17,2; 318,4 ± 29,9; 360,0 ± 50,9; 230,2 ± 21,7; 126,8 ± 17,3; 133,4 ± 27,6]).

Verglichen mit der Isotypkontrolle ist der Anteil der rollenden CD34⁺ Zellen in der mit anti-CXCR7 vorinkubierten Gruppe etwas kleiner (rollende CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [51,3 ± 14,4 (SEM); 406,6 ± 43,3; 394,8 ± 48,4; 186,6 ± 33,7; 134,1 ± 27,4; 104,7 ± 31,2]

versus rollende CD34⁺ Zellen mit IgG₁ [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [102,0 ± 42,7; 477,1 ± 72,9; 495,9 ± 65,6; 299,2 ± 47,8; 215,8 ± 14,2; 157,2 ± 30,3]).

Ein Vergleich der CD34⁺ Zellen, die eine adhärenente Interaktion mit dem aktivierten Endothel eingehen, lässt erkennen, dass die Anzahl der adhärenenten Zellen in der mit der Isotypkontrolle vorbehandelten Gruppe höher ist (adhärenente CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [0 ± 0 (SEM); 25,0 ± 8,3; 47,3 ± 12,1; 52,6 ± 10,1; 70,3 ± 9,2; 56,0 ± 12,0] versus adhärenente CD34⁺ Zellen mit IgG₁ [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: [0 ± 0; 45,7 ± 17,0; 79,0 ± 21,8; 107,7 ± 23,9; 113,2 ± 20,2; 117,1 ± 27,1]).

Sowohl bei den transient adhärenenten, als auch bei den rollenden und adhärenenten CD34⁺ Zellen zeichnet sich die Tendenz ab, dass in der mit anti-CXCR7 vorbehandelten Gruppe weniger CD34⁺ Zellen auftreten. Allerdings kommen bei der Interaktionsart der adhärenenten Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zustande, während bei den transient adhärenenten und rollenden Zellen bei wenigen Zeitpunkten nach Reperfusion signifikante Unterschiede bestehen.

3.3.4.2.4 Vergleich von anti-CXCR7 vorbehandelten CD34⁺ Zellen mit der Isotypkontrolle in den Arteriolen

Nachfolgend werden die Schaubilder (Abb. 77, 78 und 79) dargestellt, welche einen Vergleich der CD34⁺ Zellen in den Arteriolen zeigen, die mit anti-CXCR7 oder der entsprechenden Isotypkontrolle (IgG₁) vorinkubiert wurden.

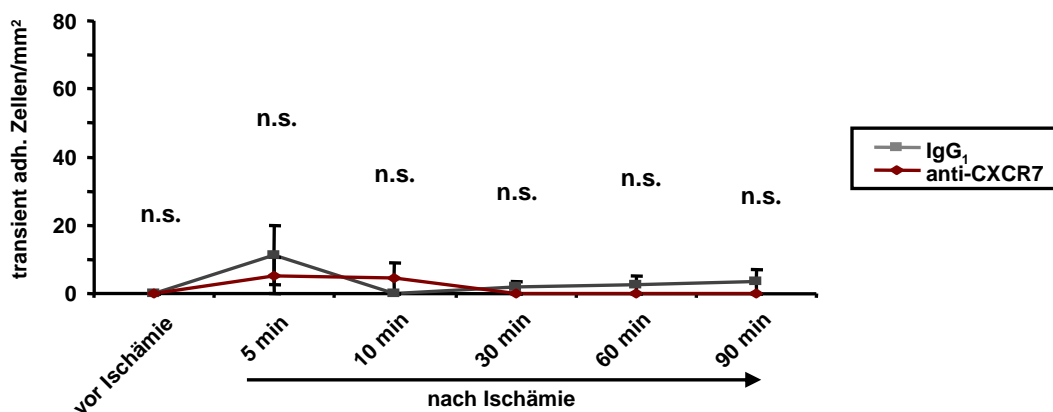


Abb. 77: Anzahl transient adhärenenter Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR7: n=6; IgG₁: n=6). * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

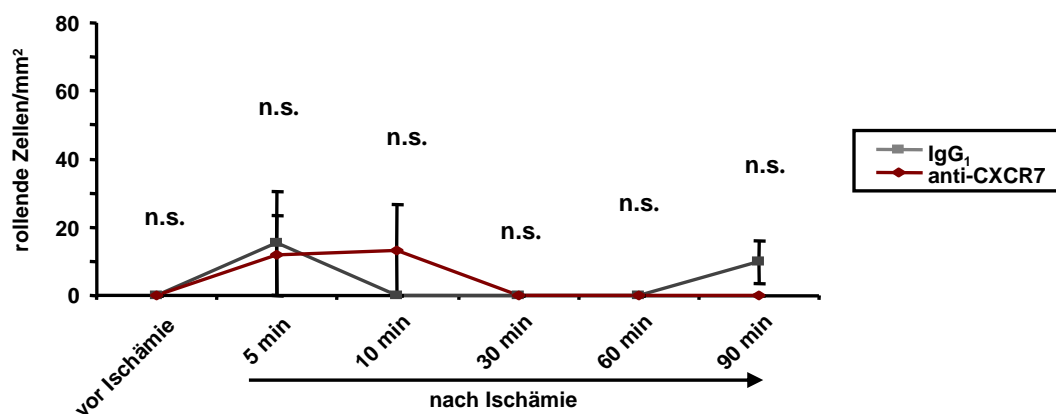


Abb. 78: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR7: $n=6$; IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

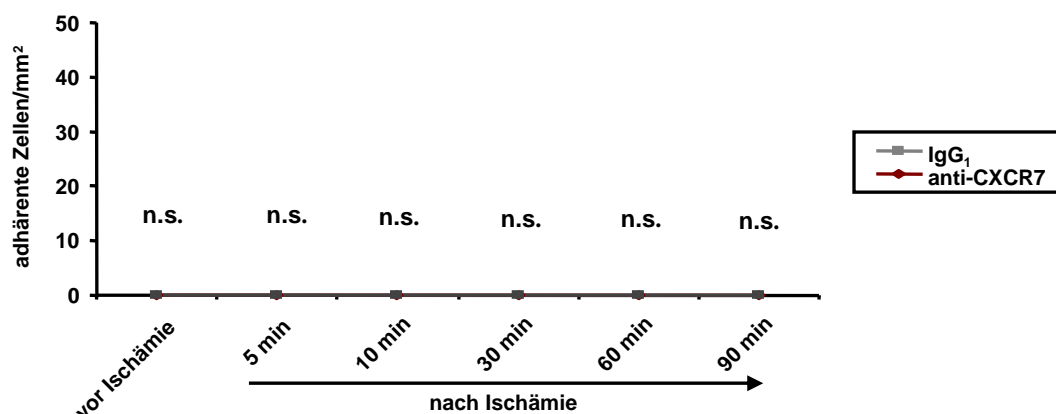


Abb. 79: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen) (anti-CXCR7: $n=6$; IgG₁: $n=6$). * $p<0,05$; n.s., nicht signifikant.

Bis auf den 5 Minuten Zeitpunkt nach Ischämie, kommen in beiden Gruppen kaum $CD34^+$ Zellen vor, die eine transiente Interaktion mit dem Endothel eingehen (transient adhärenente $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0$ (SEM); $5,2 \pm 5,2$; $4,4 \pm 4,4$; 0 ± 0 ; 0 ± 0 ; $0 \pm 0]$ versus transient adhärenente $CD34^+$ Zellen mit IgG₁ [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0$; $11,2 \pm 8,7$; 0 ± 0 ; $1,8 \pm 2,1$; $2,5 \pm 2,5$; $3,5 \pm 3,5]$).

Auch die Anzahl an rollenden Zellen ist in beiden Gruppen vergleichbar gering (rollende $CD34^+$ Zellen mit anti-CXCR7 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0$ (SEM); $11,8 \pm 11,8$; $13,3 \pm 13,3$; 0 ± 0 ; 0 ± 0 ; $0 \pm 0]$ versus rollende $CD34^+$ Zellen mit IgG₁ [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Ischämie]: $[0 \pm 0$; $15,3 \pm 15,3$; 0 ± 0 ; 0 ± 0 ; 0 ± 0 ; $9,8 \pm 6,4]$).

Adhärente $CD34^{+}$ Zellen sind weder in der mit anti-CXCR7, noch in der mit der Isotypkontrolle vorinkubierten Gruppe vorhanden.

Zu keinem Zeitpunkt bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

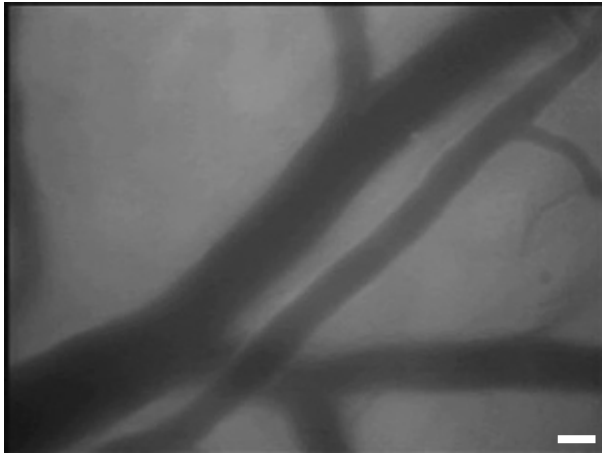


Abb. 80.1: $CD34^{+}$ Zellen mit anti-CXCR7 vor Ischämie.

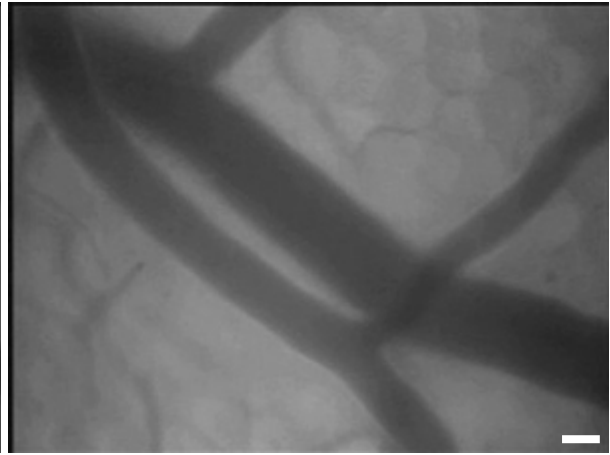


Abb. 80.2: $CD34^{+}$ Zellen mit IgG_1 vor Ischämie.

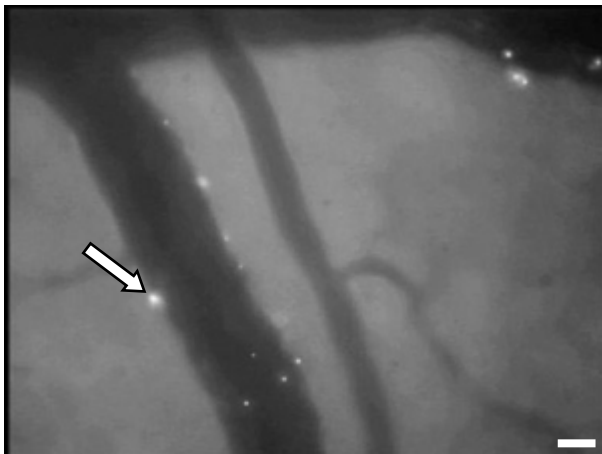


Abb. 80.3: $CD34^{+}$ Zellen mit anti-CXCR7 30 Minuten nach Ischämie.

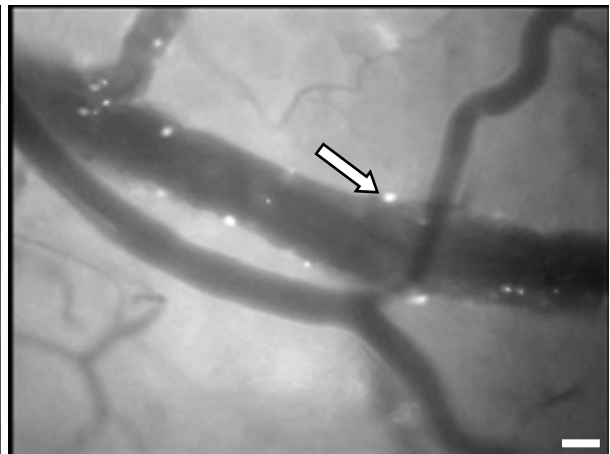


Abb. 80.4: $CD34^{+}$ Zellen mit IgG_1 30 Minuten nach Ischämie.



Abb. 80.5: $CD34^{+}$ Zellen mit anti-CXCR7 60 Minuten nach Ischämie.

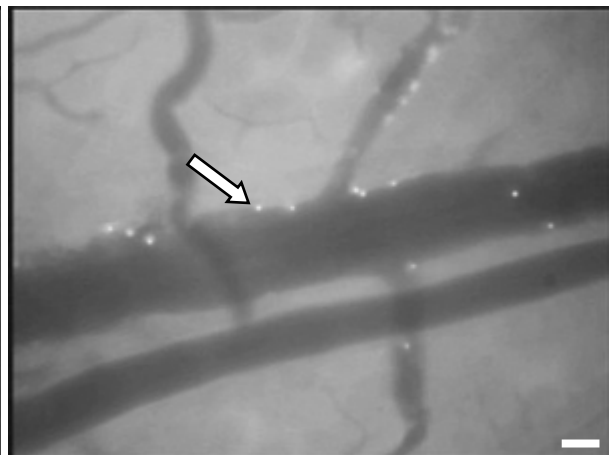


Abb. 80.6: $CD34^{+}$ Zellen mit IgG_1 60 Minuten nach Ischämie.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

4.1.1 Das Mausmodell

Bei der Planung von *in vivo* Versuchen stellt sich stets die Frage, an welchem Tiermodell die Untersuchungen durchgeführt werden sollen. Aufgrund der Tatsache, dass in dieser Arbeit die Methode der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt wird, spielt aus technischen Gründen die Schichtdicke des zu durchdringenden Materials eine maßgebliche Rolle. Die Wanddicke des Gefäßes gilt daher als limitierender Faktor. Bei der Maus ist die Gefäßwand dünn und daher können Interaktionen zwischen Zellen und Gefäßwand besser dargestellt werden als beispielsweise in Gefäßen von Ratten (LINDNER et al. 1993; MASSBERG et al. 1998a).

Weitere Vorteile bieten neben der platzsparenden und kostengünstigen Haltung, die kurze Generationszeit der Mäuse und das einfache "Handling" der Tiere. Überdies ist der Verbrauch an Narkotika, Diagnostika und Therapeutika um ein vielfaches geringer als bei größeren Versuchstieren. Von großem Vorteil ist auch, dass durch genetische Manipulation der Mäuse die verschiedensten Knockout-Stämme generiert werden können. Zudem steht eine große Menge an monoklonalen Antikörpern zur Verfügung.

In dieser Arbeit werden Wildtypmäuse (C57BL/6J) für die Intravitalmikroskopie herangezogen. Immunologische Unverträglichkeiten durch die verwendeten Zellen treten in diesem Fall nicht auf, da die Tiere nach Versuchsende unverzüglich getötet werden. Sollten für die Zukunft aber Langzeitversuche geplant sein, muss auf den Einsatz von immundefizienten Mäusen geachtet werden.

4.1.2 Die Methode der Intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (IVM)

4.1.2.1 Darstellung von Zellinteraktionen mit der Gefäßwand mittels IVM

In der vorliegenden Arbeit kommt die Methode der Intravitalmikroskopie zum Einsatz, durch die die Interaktion von Zellen mit dem Gefäßendothel optisch dargestellt werden kann. Es

handelt sich hierbei um eine gängige Methode, die auch in diversen anderen Organsystemen wie beispielsweise dem Auge oder der Milz Anwendung findet (MENGER und LEHR 1993; GONZALEZ et al. 1994; FRENETTE et al. 1995; FRENETTE et al. 1998; MASSBERG et al. 1998a; ERIKKSON et al. 2000; VAJKOCZY et al. 2000; VOLLMAR et al. 2000; GRAYSON et al. 2001; KOSEKI et al. 2001; VOLLMAR et al. 2001; EICHHORN et al. 2002). Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie dient dazu physiologische und pathologische Vorgänge der Hämodynamik am lebenden Versuchstier zu beobachten. Die Technik beruht darauf, dass Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes markiert werden, wodurch diese *in vivo* visualisiert werden können. In dieser Arbeit wird der in der Literatur häufig beschriebene Fluoreszenzfarbstoff DCF (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate) verwendet (KOSEKI et al. 2001; MASSBERG et al. 2003a; MASSBERG et al. 2003b; MASSBERG et al. 2006).

Die Einteilung der Zellen nach Art der Interaktion mit dem Gefäßendothel wird aus der Literatur übernommen. So unterscheidet man zwischen sich im Blutfluss frei bewegenden Zellen, sowie rollenden und adhärenen Zellen. In der vorliegenden Arbeit erfolgt eine zusätzliche Unterteilung der adhärenen Zellen in transient adhärenen Zellen, welche kürzer als 15 Sekunden am Endothel haften, und fest adhärenen Zellen, die mindestens 15 Sekunden an die Gefäßwand binden. In der Literatur reichen die Sekundenwerte bezüglich der Minstdauer der Anhaftung adhärenen Zellen von 5 bis 30 Sekunden. Rollende Zellen werden über die Eigenschaft definiert, dass ihre Rollgeschwindigkeit langsamer als die Fließgeschwindigkeit des Blutflusses selbst sein muss (GONZALEZ et al. 1994; MASSBERG 1998a; MASSBERG 1998b; EICHHORN et al. 2002).

Im Blutkreislauf liegt überwiegend eine laminare Strömung vor. Allerdings können unter pathophysiologischen Bedingungen, beispielsweise bei Gefäßstenose, aber auch unter physiologischen Bedingungen bei hohen Fließgeschwindigkeiten in großen Gefäßen, Turbulenzen auftreten (KUSCHINSKY 1999). In großen Arterien wie beispielsweise der A. carotis communis ist die Blutströmungsgeschwindigkeit hoch, in den Venolen und Arteriolen des Darmes beispielsweise dagegen niedriger. Aufgrund dieser unterschiedlich vorherrschenden Strömungsgeschwindigkeiten und Scherkräfte im Gefäßsystem wird daher zwischen der Makro- und Mikrozirkulation unterschieden. Deshalb kommen in der vorliegenden Arbeit zwei Verletzungsmodelle der Maus zum Einsatz. Für die Makrozirkulation steht ein ligaturindiziertes Verletzungsmodell der Arteria carotis communis,

während durch ein Ischämie-Reperfusionsmodell des Dünndarms Vorgänge in der Mikrozirkulation widergespiegelt werden.

Auf den Vergleich beider Modelle hinsichtlich der Art der Verletzung und des daraus resultierenden Adhäsionsverhaltens der in dieser Arbeit zum Einsatz kommenden humanen Monozyten, Thrombozyten und CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen, wird in Kapitel 4.2.4 eingegangen.

4.1.2.2 Mögliche Komplikationen und Schwierigkeiten bei der IVM

Im Verlauf eines Versuchs können bei beiden Verletzungsmodellen Schwierigkeiten auftreten. Es kommt vor, dass bei den Mäusen aufgrund der mehrstündigen Versuchsdauer in beiden Modellen und der im Darmmodell zusätzlich belastenden Ischämiephase von einer Stunde Kreislaufprobleme auftreten. Die Hauptkomplikation beim Darmmodell liegt darin, dass durch die Kreislaufschwäche der Blutfluss in der Reperfusionsphase erst verzögert eintritt oder vollständig sistiert, was keine Aufnahmen zeitnah zur Reperfusion zulässt. Eine verzögerte Reperfusion tritt im Carotismodell im Vergleich zum Darmmodell nicht auf. Intravitalmikroskopische Aufnahmen bis zu einer Dauer von 90 Minuten nach Reperfusion werden daher nur im Darmmodell durchgeführt.

Außerdem besteht im Darmmodell die Schwierigkeit, dass durch eine verstärkte Darmperistaltik unscharfe Aufnahmen zustande kommen können, die technisch kaum zu beheben sind. Die Änderung der Temperatur der Wärmematte oder der Ringerlösung, die zur Befeuchtung des Darmsegments dient, kann im Einzelfall Abhilfe schaffen. Zudem gelingt es bei einigen Tieren nicht, das gewünschte Darmsegment auf der vorgefertigten Unterlage so zu positionieren, dass die Darmgefäße in einer Ebene zum Liegen kommen. Die Folge davon sind auch in diesem Fall undeutliche Aufnahmen. Unscharfe Aufnahmen können zudem dann auftreten, wenn die Darmwand infolge des Ischämie-Reperfusionsschadens gegen Versuchsende ödematös wird.

Bei beiden Modellen besteht die Gefahr, dass es bereits vor Setzen der Ligaturen aus präparationsbedingten Gründen zu Verletzungen des Endothels kommt, was eine ungewollte Thrombusbildung fördert und dazu führt, dass ein Teil der verabreichten Zellen bereits vor induziertem Schaden an die Gefäßwand bindet. Zur Bildung von Thromben kann es zudem kommen, wenn der Zug der Ligaturen auf die Gefäße zu stark ausgeprägt ist. Im schlimmsten Fall kommt der Blutfluss infolge der Thromben zum Erliegen.

Alle Mäuse, bei denen eine Beurteilung der Aufnahmen aufgrund beschriebener Komplikationen nicht möglich war, wurden nicht in die Auswertung mit aufgenommen.

4.1.3 Die Verwendung der Antikörper anti-CXCR4 und anti-CXCR7

4.1.3.1 Gründe für die Wahl von anti-CXCR4 und anti-CXCR7 in vivo

Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen, zu denen auch die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 gehören, sind das häufigste Angriffsziel in Bezug auf den Einsatz medikamentöser Therapien (MA und ZEMMEL 2002).

Bei anti-CXCR4 und anti-CXCR7 handelt es sich um monoklonale Antikörper, die spezifisch gegen die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf humanen Zellen gerichtet sind. In der vorliegenden Arbeit werden diese Antikörper mit dem Ziel angewandt, genannte Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu blockieren, um Aufschluss darüber zu erhalten, ob diese Rezeptoren eine Rolle für die Zelladhäsion an Endotheldefekte *in vivo* spielen.

Auf den Einsatz von Knockout-Mäusen konnte in dieser Arbeit nicht zurückgegriffen werden, da sowohl CXCR7^{-/-} als auch CXCR4^{-/-} Mäuse aufgrund lethaler Missbildungen des Herzens *post natum* nicht lebensfähig sind (SIERRO et al. 2007; GERRITS et al. 2008).

Gegenstand der Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist unter anderem, die differenzielle Rolle der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 bezüglich der Adhäsion humaner Monozyten, Thrombozyten und CD34⁺ Progenitorzellen *in vitro* und *in vivo* zu evaluieren. Basierend auf *in vitro* Ergebnissen, die mit Hilfe des Flusskammermodells zunächst erhoben wurden, baut sich die Thematik der vorliegenden Arbeit auf.

Mittels Durchflusszytometrie, konfokaler Mikroskopie und Western Blots wurde die Positivität der verwendeten Zelltypen auf CXCR4 und CXCR7 getestet. Die Funktionalität der Antikörper wurde in vorausgehenden Experimenten in der Flusskammer bestätigt (siehe Kapitel 4.1.4.2 und 4.1.4.3). Auf die Darstellung dieser Daten wird jedoch in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

Die Arbeitshypothese stützt sich auf den medizinischen Hintergrund, dass die Adhäsion humaner Monozyten, Thrombozyten und CD34⁺ Progenitorzellen über den CXCR7-beziehungsweise den CXCR4-Rezeptor im Kontext von Geweberegeneration sowie Atherosklerose und Thrombose als initialer Schritt gelten könnte, derartige (patho)physiologische Prozesse einzuleiten. Es ist bekannt, dass bei Eintreten eines

ischämischen Gewebeschadens, wie zum Beispiel bei einem Myokardinfarkt, vermehrt SDF-1 freigesetzt wird (ASKARI et al. 2003; ABBOTT et al. 2004; WOJAKOWSKI et al. 2004; WEI et al. 2007). Dieser Effekt ist unter anderem auf eine durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) induzierte SDF-1 Expression durch Endothelzellen bei Hypoxie zurückzuführen (CERADINI et al. 2004; CERADINI und GURTNER 2005). Außerdem korreliert die Aktivierung von Thrombozyten (P-Selektin-Expression) bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit einer erhöhten Thrombozyten-SDF-1 Expression (STELLOS et al. 2009; STELLOS et al. 2010b). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Tiermodellen wird aufgrund der gesetzten Verletzung ebenfalls eine endotheliale beziehungsweise thrombozytäre SDF-1 Expression induziert. Über SDF-1, als Chemokin-Ligand von CXCR7 und CXCR4, kann nachfolgend die Adhäsion von Zellen begünstigt werden. Auch für andere Chemokinrezeptoren ist beschrieben, dass sie über entsprechende Chemokinliganden auf aktivierten Endothelzellen funktionell als eine Art Adhäsionsrezeptor fungieren können (siehe Kapitel 2.4.4; 2.5.4; 2.6.4) (VON HUNDELSHAUSEN et al. 2005; KOCHER et al. 2006; SCHÖMIG et al. 2006).

Über die Bildung von Heterodimeren mit CXCR4 ist CXCR7 für die SDF-1-getriggerte, CXCR4-abhängige Aktivierung von Integrinen wie VLA-4 beziehungsweise LFA-1 auf humanen Lymphozyten und CD34⁺ Zellen verantwortlich, welche die Adhäsion an aktivierte Endothelzellen unter Flussbedingungen *in vitro* vermitteln (SIERRO et al. 2007; HARTMANN et al. 2008; LEVOYE et al. 2009). Dass diese Effekte durch die Blockade von CXCR7 inhibiert werden können zeigt, dass CXCR7 als eine Art Modulator des CXCR4-abhängigen Signalings fungiert. CXCR7 Blocker stellen also ein wertvolles Werkzeug dar, die CXCR4 vermittelte Integrinaktivierung zu beeinflussen (HARTMANN et al. 2008). Vergleichbare *in vivo* Daten liegen dazu bislang nicht vor.

4.1.3.2 Schwierigkeiten bei der Verwendung von anti-CXCR4 und anti-CXCR7

Die Schwierigkeit, den CXCR7- oder den CXCR4 - Rezeptor durch die genannten Antikörper zu blockieren besteht darin, dass die Oberflächenexpression der Rezeptoren variieren kann. CXCR4 wird auf Proteinebene von diversen Zelltypen exprimiert. CXCR7 kommt zwar ebenfalls auf vielen Zellarten vor, in reichlichem Maße jedoch hauptsächlich auf embryonalen und neoplastisch transformierten Zellen (BURNS et al. 2006; MIAO et al. 2007; SCHUTYSER et al. 2007; GOLDMANN et al. 2008; WANG et al. 2008a). Die Expression von Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche kann auf translationaler Ebene über die

Regulation der Proteinsynthese und auf post-translationaler Ebene durch die Internalisierung des aktivierten Rezeptors und den nachfolgenden endosomalen Abbau beziehungsweise den Wiedereinbau in die Zellmembran reguliert werden (KUCIA et al. 2005; MAKSYM et al. 2009). In T-Lymphozyten beispielsweise befindet sich die Mehrheit an CXCR7 in intrazellulären Kompartimenten, den sogenannten „early-endosomes“. Demzufolge kann auf Proteinebene beispielsweise mehr intrazelluläres CXCR7 detektiert werden, wenn die Zellen in permeabilisierter Form vorliegen (HARTMANN et al. 2008).

Die Konsequenz der geschilderten Problematik für die Blockade der in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen besteht darin, dass nur die Rezeptoren durch die blockierenden Antikörper anti-CXCR4 und anti-CXCR7 erfasst werden können, die sich auf der Zelloberfläche befinden. Wie im zweiten Abschnitt dieses Kapitels bereits erwähnt, wurden die verwendeten Zelltypen vor dem Einsatz im Tiermodell auf eine grundsätzliche Oberflächenexpression beider Chemokinrezeptoren getestet. Eine Messung erfolgte jedoch nicht extra für die eingesetzten Zellen der jeweiligen Versuche.

4.1.4 Gründe für den Einsatz von humanen Monozyten, Thrombozyten und CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit leitet sich aus dem kardiovaskulären Forschungsbereich ab. Es gilt stets, neue Wege zu finden, humane Thrombozyten, Monozyten und CD34⁺ Zellen hinsichtlich ihrer Beteiligung bei der Entstehung oder der Heilung von Herz-Kreislaufkrankungen zu beeinflussen.

4.1.4.1 Der Einsatz von humanen Monozyten

Viele Studien belegen, dass die Rekrutierung von Monozyten an die Gefäßwand zu den frühen Schritten der Atheroskleroseentstehung gehört (GERRITY 1981; ROSS 1993). Nahezu dreiviertel aller Todesfälle, die auf Herz-Kreislaufkrankungen zurückzuführen sind, haben ihre Ursache in der Entstehung von atherosklerotischen Plaques, die bei Ruptur einen Herzinfarkt oder Schlaganfall zur Folge haben können (MESTAS und LEY 2008).

Die Ablagerung von oxidiertem LDL im Subendothel als Initiator der Atherosklerose führt zur Aktivierung von Endothelzellen, die daraufhin einen inflammatorischen Charakter annehmen. Dabei werden Chemokine exprimiert und Adhäsionsmoleküle hochreguliert, was die Rekrutierung von Monozyten zur Folge hat (GEBUHRER et al. 1995; KHAN et al. 1995).

Vor allem die Adhäsionsmoleküle P-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 sind für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen von maßgeblicher Bedeutung (DONG et al 1998; SHIH et al. 1999; COLLINS et al. 2000). Durch die Phagozytose von Lipiden wandeln sich Monozyten nach und nach in Schaumzellen um, was die Progression der Atherosklerose vorantreibt (GAWAZ 1999; ROESSNER et al. 2001).

Mögliche Ansätze der Intervention müssen darin liegen, das Homing von Monozyten zu beeinflussen, das heißt, bereits die Adhäsion von Monozyten zu inhibieren und die nachfolgende Differenzierung in Schaumzellen zu verhindern.

Für diverse Chemokinrezeptoren und ihre Liganden ist bereits beschrieben, dass der Knockout sowohl des Rezeptors, als auch des Chemokins die Bildung atherosklerotischer Plaques reduziert, was unter anderem auf eine verminderte Rekrutierung von Leukozyten zurückzuführen ist (siehe auch Kapitel 2.4) (BRAUNERSREUTHER et al. 2007; BRAUNERSREUTHER 2008).

Der Chemokinrezeptor CXCR7 auf Monozyten könnte, in für Atherosklerose anfälligen Gefäßabschnitten, ebenfalls eine Rolle bei der Adhäsion von Monozyten an aktiviertes Endothel spielen. Inwiefern CXCR7 direkt an der Differenzierung von Monozyten in Schaumzellen beteiligt ist, bleibt in Zukunft noch zu evaluieren.

Für die CXCR4/SDF-1 Achse konnten Zernecke et al. (2008) eine atheroprotektive Funktion *in vivo* nachweisen. Eine andauernde Beeinträchtigung der CXCR4/SDF-1 Achse, durch genetische CXCR4-Defizienz im Knochenmark oder den CXCR4-Antagonisten "AMD3465" verursacht, verschlimmert eine Diät-induzierte Atherosklerose in ApoE^{-/-} oder Ldlr^{-/-} Mäusen. Dieser Effekt ist ursächlich auf eine Imbalance in der Hämatopoese zurückzuführen, wobei vermehrt unreife, aber funktionstüchtige neutrophile Granulozyten entstehen, welche an atherosklerotische Bereiche rekrutiert werden und die Plaqueprogression fördern (ZERNECKE et al. 2008).

Über den direkten Einfluss des CXCR4-Rezeptors auf die Adhäsion humaner Monozyten an Endotheldefekte *in vivo* liegen jedoch bislang keine Daten vor.

4.1.4.2 Der Einsatz von humanen Thrombozyten

Neben dem physiologischen Prozess der Hämostase sind Thrombozyten auch an pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. Thrombozyten sind diejenigen Zellen, welche bei einem Gefäßschaden als erstes den Kontakt mit der Gefäßwand und verschiedenen anderen

zirkulierenden Blutzellen aufnehmen und Prozesse wie die Atherogenese, Thrombose und Gefäßinflammation einleiten (GAWAZ et al. 2005; MAY et al. 2007). Eine erhöhte Adhäsion von Thrombozyten an Endothel findet in der Mikrozirkulation entzündeter Gewebsbereiche und während der Reperfusionsphase in ischämischen Organen statt (MASSBERG et al. 1998b; MASSBERG et al. 2004).

Thrombozyten können die Atherogenese initiieren und vorantreiben (MASSBERG et al. 2002; BURGER und WAGNER 2003; HUO et al. 2003; MASSBERG et al. 2003a). Die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an Endothel hat nämlich zur Folge, dass Endothelzellen aktiviert werden und einen proinflammatorischen Charakter annehmen, wodurch die Adhäsion von Leukozyten begünstigt wird (GAWAZ et al. 1997; GAWAZ et al. 1998; GAWAZ et al. 2000 MASSBERG et al. 2002; THEILMEIER et al. 2002). So kommt es beispielsweise zur Rekrutierung von Monozyten, die von Thrombozyten wiederum zur Sekretion von Cytokinen, Chemokinen und Proteasen angeregt werden. Dies fördert die Differenzierung von Monozyten in Schaumzellen, einer der initialen Schritte der Atheroskleroseentstehung. Im Falle der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque mit Verletzung der Gefäßwand, besteht die Gefahr einer Gefäßokklusion durch Thrombose mit Komplikationen wie dem akuten Myokardinfarkt (GAWAZ et al. 2005b).

Die Aktivierung von Thrombozyten steht nicht nur mit kardiovaskulären Ereignissen wie der instabilen Angina pectoris, dem akuten Myokardinfarkt (GAWAZ et al. 1996; OTT et al. 1996; NEUMANN et al. 1998; NEUMANN et al. 1999; FURMAN et al. 2001; MICHELSON et al. 2001) oder der Stentthrombose in Zusammenhang und beeinflusst das klinische "outcome" nach Eingriffen wie beispielsweise Stentimplantation, sondern auch mit inflammatorischen Erkrankungen wie der Sepsis (GAWAZ et al. 1995; GAWAZ et al. 1997; OGURA et al. 2001; LEVI 2005), der Arthritis (JOSEPH et al. 2001) oder der Inflammatory Bowel Disease (DANESE et al. 2004).

Auf der anderen Seite gehören zu den physiologischen und regenerativen Aufgaben der Thrombozyten der Schutz vor größeren Blutverlusten bei Gefäßverletzungen durch Einleitung der Hämostase (GAWAZ et al. 2005b) sowie die Beteiligung an Geweberegenerationen (ANITUA et al. 2004; LESURTEL et al. 2006; NOCITO et al. 2007; LANGER und GAWAZ 2008) und an der Angiogenese (ENGLISH et al. 2001) durch die Sekretion von diversen Mediatoren und angiogenetischen Faktoren wie beispielsweise SDF-1, Cytokinen wie PF4 und Wachstumsfaktoren wie "vascular endothelial growth factor", "platelet derived growth

factor", "transforming growth factor β ", "epidermal growth factor" und "angiopoietin-related growth factor" (SPENCER et al. 1993; OIKE et al. 2003; GAWAZ et al. 2005b) .

Möglichkeiten, den Kontakt zwischen Thrombozyten und der Gefäßwand zu inhibieren, sind der Knockout von Adhäsionsrezeptoren in Plättchen oder die Blockade von Adhäsionsrezeptoren durch Antikörper. In verschiedenen Mausmodellen konnte auf diesem Weg die Bildung atherosklerotischer Läsionen reduziert werden (BURGER und WAGNER 2003; HUO et al. 2003; MASSBERG et al. 2005). Außerdem lässt eine erfolgreiche Inhibierung der Thrombozytenfunktion im Patienten das Risiko unerwünschter kardiovaskulärer Ereignisse bei akuten kardiovaskulären Syndromen und Interventionen sinken (TOPOL et al. 2001; KASTRATI et al. 2006).

Es konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits *in vitro* (Flusskammer) gezeigt werden, dass die Adhäsion humaner Thrombozyten auf immobilisiertem SDF-1 durch die Blockade der Rezeptoren CXCR4 oder CXCR7 signifikant reduziert ist im Vergleich zur Adhäsion von Thrombozyten, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle vorinkubiert wurden (STELLOS et al., in Vorbereitung). Des Weiteren untersuchten wir mit Hilfe der Durchflusszytometrie die CXCR7 Oberflächenexpression auf ruhenden und aktivierten Plättchen. Die Vorinkubation von Thrombozyten mit ADP geht dabei mit einer erhöhten CXCR7 Expression, nicht jedoch mit einer erhöhten CXCR4 Expression, einher. Ob dieser Aspekt eine funktionelle Bedeutung für das Aggregationsverhalten von Thrombozyten hat, wird in Zukunft von unserer Arbeitsgruppe noch untersucht werden.

Anhand von Erkenntnissen über die Bedeutung des CXCR7- sowie des CXCR4- Rezeptors für die Thrombozytenadhäsion an Endotheldefekte *in vivo*, könnten Strategien entwickelt werden, einer überschießenden Thrombozytenadhäsion mit allen pathologischen Folgen entgegenzuwirken.

4.1.4.3 Der Einsatz von humanen CD34⁺ hämatopoetischen Progenitorzellen

Aus den Ergebnissen intensiver Stammzellforschung und Stammzelltherapie der letzten Jahrzehnte geht hervor, dass aus dem Knochenmark stammende, gewebständige sowie zirkulierende Stamm- und Progenitorzellen, einschließlich hämatopoetischer CD34⁺ Progenitorzellen, ein enormes Differenzierungspotential aufweisen und dadurch zur

Regeneration einer Vielzahl von Organen nach einem Gewebeschaden sowie zur Wiederherstellung der vaskulären Integrität beitragen (ASAHARA et al. 1997; TAKAHASHI et al. 1999; KALKA et al. 2000b; ASSMUS et al. 2002; DIETRICH UND KEMPERMANN 2006; MURRY et al. 2006; SHAFRITZ et al. 2006). Gerade in der kardiovaskulären Forschung wird intensiv nach effizienteren Methoden gesucht, um die Rekrutierung endogener sowie applizierter Stammzellen in ischämisch geschädigte Herzareale nach Myokardinfarkt zu verbessern. Derzeit gängige Methoden dies zu erreichen umfassen nach Auftreten eines Myokardinfarkt beispielsweise die intrakoronare oder transkoronare Transplantation und die systemische Gabe von Progenitorzellen sowie die Mobilisierung endogener Stammzellen durch die systemische Applikation von G-CSF (DIMMELER et al. 2005; ASSMUS et al. 2006; HONOLD et al. 2006; KASTRUP et al. 2006; RIPA et al. 2006; SCHÄCHINGER et al. 2006). In Anbetracht der Tatsache, dass diese Methoden aber lediglich mit einer marginalen Verbesserung der Herzfunktion einhergehen, was auf eine begrenzte beziehungsweise unvollständige Rekrutierung von Stammzellen zurückzuführen ist, müssen die zur "Ansiedlung" von Stammzellen beitragenden Mechanismen nach Gewebeschaden noch weiter untersucht werden (STRAUER et al. 2002; DIMMELER et al. 2005; SCHÄCHINGER et al. 2006).

Abgesehen von den regenerativen Eigenschaften, wird die Beteiligung von Stammzellen an der Atherogenese kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wird angenommen, dass eine reduzierte Zahl von Progenitorzellen zu einer schlechteren Gefäßregeneration führt, wodurch die Rekrutierung von Entzündungszellen und die Infiltration der dysfunktionalen Gefäßwand mit oxidiertem LDL erleichtert wird (WERNER et al. 2005). Zudem weisen Patienten mit erhöhtem Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung eine herabgesetzte Anzahl an zirkulierenden Progenitorzellen mit verminderter Aktivität auf (HEISS et al. 2005; SCHMIDT-LUCKE et al. 2005; URBICH UND DIMMELER 2005). Außerdem ist bekannt, dass Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie eine geringere Anzahl an zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen aufweisen. Zusätzlich ist die Funktionalität dieser Zellen durch Beeinträchtigung des Migrationsverhaltens und der Fähigkeit zur Differenzierung in endotheliale Kolonien *in vitro* eingeschränkt (VASA et al. 2001; XU 2006). Progenitorzellen, die an verletzte Gefäßwandbereiche migrieren, können sich jedoch nicht nur zu Endothelzellen differenzieren und somit die Gefäßregeneration fördern (ASAHARA et al. 1997). So gibt es auf der anderen Seite Untersuchungen, die belegen, dass auch eine Differenzierung in glatte Muskelzellen,

Makrophagen und Schaumzellen erfolgen kann. Derartige Differenzierungsvorgänge fördern wiederum die Entstehung atherosklerotischer Plaques sowie die Neointimabildung und -hyperplasie (HAN et al. 2001; SAIURA et al. 2001; SATA et al. 2002; TANAKA et al. 2003; HU et al. 2004; DAUB et al. 2006).

Die Entdeckung neuer zellulärer Mechanismen und gewebespezifischer Chemokine, welche die Rekrutierung von Stamm- und Progenitorzellen begünstigen, könnte hilfreich sein bei der Entwicklung zukünftiger Strategien, die kardiovaskuläre Regeneration und die Geweberevaskularisierung voranzutreiben (DIMMELER et al. 2005). Es ist bekannt, dass das Chemokin SDF-1 gemeinsam mit dem Rezeptor CXCR4 das Homing CXCR4⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark in die Blutzirkulation und das periphere Gewebe wie beispielsweise in ischämische Myokardareale oder verletzte Gefäßabschnitte steuert (AIUTI et al. 1997; SCHOBER et al. 2003; ABBOTT et al. 2004). Stellos et al. (2008) konnten zudem zeigen, dass auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiertes SDF-1 die Adhäsion von CXCR4⁺/CD34⁺ Progenitorzellen an immobilisierte Plättchen unter Flussbedingungen *in vitro* und an beschädigte Gefäßabschnitte *in vivo* vermitteln. Außerdem ergab diese Studie, dass an Endothelzellen gebundene Thrombozyten über die Expression von SDF-1 die Rekrutierung von CXCR4⁺/CD34⁺ Progenitorzellen an aktivierte Endothelzellen *in vitro* und an aktivierte Endothelzellen in der Mikrozirkulation nach Ischämie-Reperfusion-induziertem Schaden *in vivo* unterstützen. Bei den *in vivo* Versuchen kamen die gleichen Verletzungsmodelle, die ebenfalls mit Hilfe der Intravitalmikroskopie untersucht wurden, wie in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass *in vitro* die Adhäsion von CD34⁺ Progenitorzellen auf immobilisierten Thrombozyten durch Vorinkubation der CD34⁺ Zellen mit anti-CXCR7 und andererseits durch die Vorbehandlung der Thrombozyten mit anti-SDF-1 im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant herabgesetzt werden kann (STELLOS et al., in Vorbereitung).

Überdies konnte unsere Arbeitsgruppe darstellen, dass sowohl die SDF-1/CXCR4 Achse (STELLOS et al. 2008), also auch die SDF-1/CXCR7 Achse (STELLOS et al., in Vorbereitung) die Differenzierung von CD34⁺ Progenitorzellen in endotheliale Vorläuferzellen fördert.

Die beschriebenen Vordaten geben Hinweise darauf, dass sowohl der CXCR7 als auch der CXCR4 Rezeptor gemeinsam mit SDF-1 eine wichtige Rolle spielen bei der Adhäsion humaner hämatopoetischer CD34⁺ Progenitorzellen und deren nachfolgenden Differenzierung

in endotheliale Vorläuferzellen und somit möglicherweise zur vaskulären und myokardialen Regeneration beitragen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Bemerkungen zum Versuchsablauf bei beiden Verletzungsmodellen

Wie in Tab.1 und Tab.2 (siehe Kap. 3.2.1) dargestellt, kommen bei beiden Verletzungsmodellen drei unterschiedliche Zellarten, humane Monozyten, Thrombozyten und CD34⁺ Progenitorzellen, sowie zwei verschiedene blockierende Antikörper, anti-CXCR4 und anti-CXCR7 mit den entsprechenden Isotypkontrollen zum Einsatz.

Eine gute Qualität von Monozyten und Thrombozyten erfordert die frische Isolierung aus humanem Vollblut. Daher ist eine längere Aufbewahrung dieser Zelltypen nicht möglich. Aus diesem Grund stammen die Thrombozyten oder Monozyten von unterschiedlichen Spendern der jeweiligen Versuchstage.

CD34⁺ Progenitorzellen können dagegen nach der Isolierung aus humanem Nabelschnurblut oder Leukopherisat durchaus bei -80°C über längere Zeit aufbewahrt und erst vor Gebrauch wieder aufgetaut werden. Trotzdem ist die Herkunft der von Versuch zu Versuch verwendeten CD34⁺ Zellen auf unterschiedliche Zellchargen mit Zellen von verschiedenen Spendern zurückzuführen.

Pro Versuchstag werden zwei Wildtypmäuse (C57Bl/6J) eingesetzt, wobei die intravitalmikroskopischen Aufnahmen bei beiden Mäusen mit einer leichten Zeitverzögerung parallel und unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Zunächst wird die für zwei Tiere benötigte Gesamtmenge an Zellen isoliert und vorbereitet. Erst daraufhin werden ein Teil der Zellen mit dem blockierenden Antikörper für die erste Maus und der andere Zellanteil mit der entsprechenden Isotypkontrolle für die zweite Maus vorinkubiert. Dadurch ist gewährleistet, dass die Zellen für beide Mäuse aus derselben Quelle stammen sowie auf die gleiche Art und Weise isoliert und vorbereitet werden. Die Ergebnisse der Haupt- und Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages können unter standardisierten Bedingungen untereinander und später auch innerhalb der Versuchsgruppe besser verglichen werden.

Es wird stets darauf geachtet, dass die Mäuse innerhalb einer Versuchsgruppe aus der gleichen Bestellgruppe stammen, sodass auf die Tiere einwirkende endo- sowie exogene Faktoren weitgehend identisch sind.

4.2.2 Ergebnisse aus dem Carotismodell

4.2.2.1 Verminderte Adhäsion von Monozyten im Carotismodell durch Blockade des CXCR7-Rezeptors verglichen mit einer CXCR4-Rezeptor-Blockade

Anhand der Schaubilder in *Abb. 18 und 19* wird ersichtlich, dass eine Blockade des CXCR4 Rezeptors auf Monozyten zu keiner verminderten Adhäsion transient adhärenter und adhärenter Monozyten führt. Im Gegenteil ist deutlich zu erkennen, dass der Versuch, den CXCR4 Rezeptor auf Monozyten zu inhibieren eher einem prostimulatorischen Effekt gleich zu kommen scheint. Möglicherweise werden in der Zelle infolge der Blockade des Rezeptors endogene Effekte in Gang gesetzt, die mit der Expression von Adhäsionsrezeptoren einhergehen und die Bindung an das Endothel verstärken. Dies wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

In der mit anti-CXCR7 vorinkubierten Gruppe gehen dagegen weitaus weniger Monozyten eine transient adhärente (*Abb. 21*) sowie adhärente (*Abb. 22*) Interaktion mit der Gefäßwand ein als in der Kontrollgruppe. Obwohl zwischen diesen beiden Gruppen, mit Ausnahme des 60 Minuten Zeitpunktes bei den transient adhären Zellen, zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede vorliegen, ist dennoch die klare Tendenz ersichtlich, dass sich die Adhäsion sowohl transient adhärenter als auch adhärenter Monozyten durch Blockade des CXCR7 Rezeptors durchaus reduzieren lässt.

4.2.2.2 Signifikant reduzierte Adhäsion von Thrombozyten im Carotismodell durch Blockade des CXCR7-Rezeptors

Bei Betrachtung der *Abb. 38 und 39* wird deutlich, dass eine Vorinkubation mit anti-CXCR4 zu keinem inhibitorischen Effekt bezüglich der Adhäsion transient adhärenter und adhärenter Thrombozyten führt, was der nahezu deckungsgleiche Verlauf der Kurven und die starke Überschneidung der SEM-Werte beweisen.

Die Verwendung von anti-CXCR7 hat dagegen, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine signifikant reduzierte Anzahl an Thrombozyten zu allen Zeitpunkten nach Lösen der Ligatur zur Folge (*Abb. 41 und 42*). Dies deutet darauf hin, dass die Adhäsion transient adhärenter und adhärenter Thrombozyten durch die Blockade des CXCR7 Rezeptors deutlich inhibiert werden kann. Ob dieser CXCR7-Effekt eine Bedeutung für die Thrombozytenfunktion darstellt, bleibt in Zukunft noch zu klären.

4.2.2.3 Signifikant reduzierte Adhäsion von CD34⁺ Zellen im Carotismodell durch Blockade des CXCR4- sowie des CXCR7- Rezeptors

Die *Abb. 59* sowie *62* stellen eindeutig dar, dass sowohl anti-CXCR4 als auch anti-CXCR7 die Adhäsion adhärenter CD34⁺ Zellen im Vergleich zu den Kontrollantikörpern zu allen Zeitpunkten nach Lösen der Ligatur signifikant herabsetzen. Zudem kann mit anti-CXCR4 erreicht werden, dass die Adhäsion der transient adhärenenten Progenitorzellen signifikant vermindert wird (*Abb. 58*).

Aufgrund der inhibitorischen Effekte beider blockierender Antikörper, wurde bei den CD34⁺ Zellen durch Vorinkubation der Stammzellen mit anti-CXCR4 und anti-CXCR7 ein koinhibitorischer Effekt bezüglich der Adhäsion überprüft (*Abb. 64 und 65*). Dadurch konnte jedoch die Adhäsion nur minimal zusätzlich gesenkt werden, was an der im Durchschnitt ähnlichen Anzahl an adhärenenten CD34⁺ Zellen in den *Abb. 59, 62 und 65* zu erkennen ist.

4.2.3 Ergebnisse aus dem Darmmodell

4.2.3.1 Geringere Interaktion von Monozyten mit der Gefäßwand der Venolen unter Einsatz von anti-CXCR7 als unter Einsatz von anti-CXCR4

Wie aus den Schaubildern der *Abb. 24, 25 und 26* hervorgeht, kann die Adhäsion transient adhärenter, rollender und adhärenter Monozyten in den Venolen durch den Einsatz eines blockierenden Antikörpers gegen den CXCR4 Rezeptor nur marginal gesenkt werden im Vergleich zum Kontrollantikörper. Dies verdeutlicht der nahezu deckungsgleiche Verlauf der Kurven zu einigen Zeitpunkten nach Ischämie. In den Versuchsgruppen, bei denen anti-CXCR7 zum Einsatz kam, ergeben sich zwar lediglich teilweise signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, es zeichnet sich jedoch eine klarere Tendenz ab, dass die Blockade des CXCR7 Rezeptors zu einer verminderten Adhäsion transient adhärenter (*Abb. 31*), rollender (*Abb. 32*) und adhärenter (*Abb. 33*) Monozyten in den Venolen führt. Der Interaktion der Monozyten mit dem Endothel der Arteriolen in den *Abb. 27, 28, 29 und Abb. 34, 35, 36* kann keine große Bedeutung beigemessen werden, da die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf stark vom Mittelwert abweichende Ergebnisse einzelner Versuche zurückzuführen sind. Dies ist vor allem bei den Kontrollgruppen in *Abb. 28* zum 10 Minuten Zeitpunkt und in *Abb. 35* zum 5 Minuten Zeitpunkt nach Ischämie der Fall. Dafür könnten im

Einzelfall präparationsbedingte, makroskopisch nicht sichtbare Verletzungen des Endothels vor Ischämie verantwortlich sein.

4.2.3.2 Signifikant reduzierte Adhäsion adhärenter Thrombozyten in den Venolen unter Einsatz eines blockierenden Antikörpers gegen CXCR7

Die Schaubilder in den *Abb. 44, 45 und 46* belegen, dass die Verwendung von anti-CXCR4 keinen Einfluss hat auf die Adhäsion transient adhärenter, rollender sowie adhärenter Thrombozyten in den Venolen. Die Kurven verlaufen annähernd deckungsgleich und überkreuzen sich zu einigen Zeitpunkten nach Ischämie. Ein ähnliches Ergebnis stellt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den transient adhärenenten (*Abb. 51*) und rollenden (*Abb. 52*) Thrombozyten dar, die mit anti-CXCR7 vorbehandelt wurden. Eine Wirkung kann allerdings in Bezug auf die Thrombozyten erzielt werden, die eine feste Interaktion mit dem Endothel eingehen. Es binden zu drei Zeitpunkten nach Ischämie signifikant weniger adhärente Thrombozyten in der anti-CXCR7 Gruppe (*Abb. 53*).

Bei Beurteilung der Schaubilder in den *Abb. 47, 48 und 49* der Arteriolen fällt auf, dass bei allen drei Interaktionstypen etwas mehr Thrombozyten aus der anti-CXCR4 Gruppe mit dem Endothel wechselwirken als Thrombozyten aus der Kontrollgruppe. Das Ergebnis ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das Gefäßendothel bei einigen Mäusen in der anti-CXCR4 Gruppe bereits vor Ischämie stärker aktiviert war.

Die äußerst geringe Zellzahl in den Arteriolen der anti-CXCR7 - sowie der Kontrollgruppe lässt einen Vergleich der Gruppen nicht sinnvoll erscheinen (*Abb. 54, 55, 56*).

4.2.3.3 Reduzierte Adhäsion von CD34⁺ Zellen in den Venolen unter Einsatz eines blockierenden Antikörpers gegen CXCR4 sowie gegen CXCR7

Entsprechend der Ergebnisse im Carotismodell stellen sich die Ergebnisse für das Darmmodell in ähnlicher Weise dar. Bei diesen Versuchen führt sowohl die Blockade des CXCR4- als auch des CXCR7- Rezeptors vor allem zu einer abgeschwächten Adhäsion der transient adhärenenten (*Abb. 67 und 74*) und rollenden (*Abb. 68 und 75*) CD34⁺ Zellen in den Venolen, wobei zu einigen Zeitpunkten nach Ischämie signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe vorliegen. Der inhibitorische Effekt auf die Bindung adhärenter CD34⁺ Zellen in der anti-CXCR4 Gruppe in *Abb. 69* stellt sich weniger deutlich dar als dies

in der Studie von Stellos et al. 2008 der Fall war. Eine Ursache dafür könnte die Verwendung eines anderen Antikörperklons sein.

Ein etwas deutlicherer Unterschied in der Adhäsion fest adhärenter CD34⁺ Zellen zeichnet sich in *Abb. 76* ab. Obwohl zu keinem der Zeitpunkte nach Wiedereintreten der Reperfusion signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe vorliegen, besteht eine Tendenz, dass die Adhäsion fest adhärenter Progenitorzellen in Gegenwart von anti-CXCR7 herabgesetzt wird. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Rekrutierung von CD34⁺ vornehmlich über die CXCR4/SDF-1 Achse erfolgt (AIUTI et al. 1997; SCHOBER et al. 2003; ABBOTT et al. 2004; STELLOS et al. 2008) während der CXCR7 Rezeptor auf CD34⁺ Zellen unter Umständen als eine Art Adhäsionsrezeptor fungiert.

Aufgrund des hohen Standardfehlers beziehungsweise der geringen Anzahl an CD34⁺ Zellen in den Arteriolen aller Versuchsgruppen (*Abb. 70, 71, 72 und Abb. 77, 78, 79*) ist kein Vergleich zwischen den Gruppen evaluierbar.

Es wurde im Darmmodell auf die Durchführung von Versuchen, bei denen die CD34⁺ Zellen sowohl mit anti-CXCR4 als auch mit anti-CXCR7 beziehungsweise mit der Kombination aus den Isotypkontrollen vorinkubiert wurden, verzichtet, da das Ergebnis dieser Versuchsgruppen bereits im Carotismodell nicht den erwarteten Effekt zeigte (siehe Kapitel 4.2.2.3).

4.2.4 Vergleich beider Mausmodelle bezüglich Art und Dauer der Verletzung sowie Verteilung und Adhäsionsverhalten der verwendeten Zellen

Einer der auffälligsten Unterschiede zwischen dem Carotismodell und dem Darmmodell ist zum einen, dass in der Arteria carotis communis kaum rollende humane Monozyten, Thrombozyten und CD34⁺ Zellen vorkommen, während die rollenden Zellen im Darmmodell den größten Anteil ausmachen. Die Ursache dafür liegt in der unterschiedlichen Geschwindigkeit des Blutflusses. Die Fließgeschwindigkeit ist in großen Gefäßen wie der Arteria carotis communis wesentlich höher als in Gefäßen mit kleinerem Durchmesser (SCHUMMER und HABERMEHL 1996). Daher tritt der Prozess des Rollens häufiger in den Arteriolen und Venolen des Dünndarms auf.

Bezüglich der Anzahl der rollenden Zellen innerhalb des Ischämie-Reperfusionsmodells des Dünndarms sei zudem noch darauf hingewiesen, dass sowohl die Anzahl der transient adhärenen als auch der rollenden und adhärenen Zellen, die eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, in den Venolen weitaus höher ist als in den Arteriolen.

Zum anderen unterscheiden sich die beiden Verletzungsmodelle in der absoluten Zellzahl pro mm^2 Gefäßendothel. Obwohl das injizierte Zellvolumen in beiden Modellen stets das gleiche ist, fällt die absolute Anzahl an Monozyten, Thrombozyten und CD34^+ Zellen pro mm^2 Gefäßendothel im Darmmodell bei allen Versuchsgruppen geringer aus. Der Grund dafür ist in der Dauer sowie in der Art und Weise der Verletzung in den beiden Mausmodellen zu suchen:

Das Tier unterliegt im Darmmodell einer einstündigen Ischämiephase, wobei die verabreichten Zellen in diesem Zeitraum bereits sehr häufig im Blutkreislauf zirkulieren und unter Umständen in anderen Gefäßen und Organen wie beispielsweise der Milz abgefangen werden (GRAYSON et al. 2001; TEMPLIN et al. 2006). Die Dauer der Verletzung beträgt an der Carotis hingegen lediglich 5 Minuten. Zu Beginn der Aufnahmen ist daher ein Großteil der verabreichten Zellen noch in der Blutzirkulation vorhanden.

Im Carotismodell handelt es sich um eine direkte, mechanisch induzierte Verletzung, wobei die intravitalmikroskopischen Aufnahmen auch genau an der verletzten Stelle der Carotis stattfinden. Im Unterschied dazu ist die Verletzung im Darmmodell indirekt bedingt, da sie durch einen Ischämie induzierten Schaden hervorgerufen wird und nicht durch das Setzen der Ligatur ansich. Die Aufnahmen erfolgen daher am Darm nicht wie bei der Carotis genau an der Stelle, an der die Blutzufuhr mit Hilfe einer Ligatur unterbunden wurde, sondern an dem durch Ischämie und Reperfusion geschädigten Darmbereich.

Die mechanisch induzierte Verletzung an der Carotis führt zu einer starken Schädigung des Endothels, was mit einer Freilegung extrazellulärer Matrixkomponenten wie beispielsweise Kollagen (MASSBERG et al. 2003a; MASSBERG et al. 2003b) und dem Einsetzen der Hämostase einhergeht (RUGGERI 2002) (siehe Kapitel 2.2 und 2.5.3.1). An den Darmgefäßen wird das Endothel aufgrund einer funktionellen Störung, die durch den Ischämie-Reperfusionsschaden verursacht wurde, aktiviert und geht in einen prothrombotischen Zustand über (BECKER et al. 2000) (siehe Kapitel 2.3.2). Insgesamt gehen wir davon aus, dass aufgrund der gravierenden Schädigung an der Carotis mehr Zellen mit der Gefäßwand interagieren als dies im Darmmodell der Fall ist.

Die beiden Verletzungsmodelle weisen die Gemeinsamkeit auf, dass im Vergleich zum Anteil der transient adhären Zellen im Carotismodell und im Vergleich zu den Anteilen der transient adhären und rollenden Zellen im Darmmodell, im Durchschnitt weniger adhären Zellen in allen Versuchsgruppen beider Modelle auftreten. Dies lässt sich damit erklären, dass der Zustand der festen Adhäsion mehrere Schritte voraussetzt. Sowohl bei

Monozyten (siehe Kapitel 2.4.2), als auch bei Thrombozyten (siehe Kapitel 2.5.2) und CD34⁺ Zellen (siehe Kapitel 2.6.2) folgen der Stufe der losen Adhäsion ("tethering") der Prozess des Rollens über die Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 bis hin zur festen Adhäsion, die über β -Integrine vermittelt wird (LEVESQUE et al. 1995; GAWAZ 1999; HUO und LEY 2001). Daraus wird ersichtlich, dass ein Großteil der Zellen durch den fortlaufenden Blutfluss mitgerissen wird bevor die feste Adhäsion überhaupt vollständig eintreten kann.

4.2.5 Der Einfluß von CXCR4 und CXCR7 auf die Adhäsion humaner Monozyten im Vergleich zu anderen Adhäsionsrezeptoren

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Adhäsion humaner Monozyten sowohl im Carotismodell als auch im Darmmodell durch Blockade des CXCR7 Rezeptors teilweise inhibiert werden kann. Der CXCR4 Rezeptor spielt dagegen für das Adhäsionsverhalten eine eher untergeordnete Rolle.

Entsprechend dieser Arbeit bewiesen diverse andere Studien bereits in den 90-er Jahren, dass mit Hilfe von Inhibierungsstrategien, wie beispielsweise der Blockade von Selektinen, das Rollverhalten von Leukozyten *in vivo* beeinträchtigt werden kann (LEY et al. 1991; VON ANDRIAN et al. 1991; NOLTE et al. 1994; LEY et al. 1995; KANSAS 1996). Dabei kam wie in der vorliegenden Arbeit die Methode der Intravitalmikroskopie zum Einsatz. Die Aufnahmen wurden an Gefäßen wie beispielsweise mesenterialen Venolen, Venolen in Muskeln und Haut oder Ohrvenen von Mäusen und Ratten durchgeführt (LEY et al. 1991; NOLTE et al. 1994; LEY et al. 1995). Eine andere Studie zeigte mit Hilfe von blockierenden Antikörpern intravitalmikroskopisch an Venolen des Darmes von Kaninchen, dass bestimmte β_2 -Integrine für die feste Adhäsion von Leukozyten an Endothel verantwortlich sind (VON ANDRIAN et al. 1991).

Überdies kann in P-Selektin^{-/-} Mäusen der Vorgang des Rollens in Darmvenolen intravitalmikroskopisch nicht mehr beobachtet werden (MAYADAS et al. 1993). Außerdem führt eine β_2 -Integrin Defizienz zu einer herabgesetzten Bindung fest adhärenter Leukozyten (WILSON et al. 1993).

Um sicher zu stellen, dass die inhibierenden Effekte des blockierenden Antikörpers gegen CXCR7 in dieser Arbeit spezifisch sind, müssten die Ergebnisse ebenfalls in Knockoutmodellen validiert werden.

4.2.6 Der Einfluss von CXCR4 und CXCR7 auf die Adhäsion humaner Thrombozyten im Vergleich zu anderen Adhäsionsrezeptoren

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit stellen dar, dass vor allem im ligaturinduzierten Verletzungsmodell der Arteria carotis communis über eine Blockade des CXCR7 Rezeptors eine starke Reduktion der Adhäsion transient adhärenter und adhärenter Thrombozyten an die Gefäßwand erzielt werden kann. Auch in den Venolen des Darmes führt die Hemmung des CXCR7 Rezeptors zu einer signifikant verminderten Adhäsion adhärenter Thrombozyten. Vergleichbare Effekte können jedoch durch einen blockierenden Antikörper gegen CXCR4 in beiden Verletzungsmodellen nicht erzielt werden.

Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem Adhäsionsrezeptoren wie Selektine, Integrine und Rezeptoren des Immunglobulintyps eine vorrangige Rolle einnehmen (GAWAZ 2004). Eine Vielzahl an Tierversuchen zeigte in der Vergangenheit, dass Thrombozyten durch die Bindung an aktivierte Endothelzellen zu einem Reperfusionsschaden beitragen können (CHOUDHRI et al. 1998; LEFER et al. 1998; KUPATT et al. 2000). Daher werden in der Humanmedizin beispielsweise nach Myokardinfarkt anti-adhäsive Therapiemethoden verfolgt. Sogenannte Inhibierungsstrategien mit Hilfe von blockierenden Antikörpern gegen Adhäsionsrezeptoren zeigen im Tiermodell durchaus Erfolge im Hinblick darauf, die Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel zu beeinflussen (GAWAZ 2004). So konnten mit Hilfe der gleichen Methode wie in der vorliegenden Arbeit Massberg et al. (1998b) intravitalmikroskopisch durch den Einsatz monoklonaler Antikörper darstellen, dass Ischämie-Reperfusionsbedingte Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen unter anderem auf die Expression endothelialen P-Selektins zurückzuführen sind. Diese Ergebnisse wurden dabei durch Knockoutstrategien validiert. In einer anderen Studie konnte intravitalmikroskopisch gezeigt werden, dass ein inhibierender Antikörper gegen PSGL-1 auf Thrombozyten den Vorgang des Rollens in mesenterialen Venolen signifikant reduziert (FRENETTE et al. 2000). Ebenfalls mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie gelang an denudierten Carotiden von Wildtypmäusen der Nachweis, dass eine Blockade des GPVI-Rezeptors die Adhäsion von Plättchen an die verletzte Gefäßwand signifikant herabsetzt. Dieses Ergebnis wurde durch den Einsatz GPVI-defizienter Mäuse bestätigt (MASSBERG et al 2003a). Auf ähnliche Weise konnte durch Verwendung monoklonaler Antikörper gegen eine Reihe von Integrinrezeptoren auf Thrombozyten, wie beispielsweise $\alpha_{IIb}\beta_3$ - Integrin (Fibrinogenrezeptor) beziehungsweise über den Knockout von Integrinen, intravitalmikroskopisch gezeigt werden, dass diese

Integrinrezeptoren für die Adhäsion von Thrombozyten von maßgeblicher Bedeutung sind (GRÜNER et al. 2003).

Es muss abschließend darauf hingewiesen werden, dass endgültige Aussagen bezüglich einer spezifischen Funktion des CXCR7-Rezeptors für die Thrombozytenadhäsion, erst getroffen werden können, sobald die Daten der vorliegenden Arbeit zusätzlich in entsprechenden Knockoutstämmen überprüft wurden.

4.2.7 Der Einfluss von CXCR4 und CXCR7 auf die Adhäsion humaner hämatopoetischer CD34⁺ Stammzellen im Vergleich zu anderen Adhäsionsrezeptoren

Die eigene Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit mehreren Jahren mit dem Homing von hämatopoetischen Progenitorzellen, welches unter anderem die Rekrutierung und die Adhäsion von Stammzellen beinhaltet. Der Einsatz von Inhibierungsstrategien *in vivo* mit Hilfe blockierender Antikörper gegen ausgewählte Rezeptoren stellt dabei eine Möglichkeit dar, neue Erkenntnisse über zelluläre Adhäsionsmechanismen von Progenitorzellen herauszufinden. Diese sollen als Angriffspunkte dienen, um die Adhäsion von Stammzellen zu begünstigen und somit deren Ansiedlung in geschädigtem kardiovaskulärem Gewebe zu unterstützen.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit darstellen, lässt sich die Interaktion von CD34⁺ Stammzellen mit der Gefäßwand sowohl im Carotis- als auch im Darmmodell über eine Blockade der Chemokinrezeptoren CXCR4 und/oder CXCR7 beeinflussen. Inwiefern diese Effekte für genannte Rezeptoren spezifisch sind, muss künftig über den Einsatz von Knockoutstämmen näher untersucht werden.

Erst kürzlich konnten Stellos et al. (2010a) *in vitro* sowie mit Hilfe der gleichen Verletzungsmodelle wie in der vorliegenden Arbeit *in vivo* zeigen, dass JAM-A auf CD34⁺ Progenitorzellen über die Bindung an JAM-A auf Thrombozyten und die Bindung an LFA-1 auf Endothelzellen die Adhäsion von Progenitorzellen an die Gefäßwand vermittelt.

Vor einigen Jahren konnte über den Einsatz von blockierenden Antikörpern mit Hilfe der Intravitalmikroskopie an einem Tumorangiogenesemodell dargestellt werden, dass ein initialer Kontakt endothelialer Progenitorzellen mit dem Endothel durch E- und P- Selektin vermittelt wird (VAJKOCZY et al. 2003). Die Erforderlichkeit des E-Selektins für die Rekrutierung von Progenitorzellen und deren Beteiligung an der Neovaskularisation und Angiogenese wurde zusätzlich durch Studien in E-Selektin-defizienten Mäusen bestätigt

(NISHIWAKI et al. 2007; OH et al. 2007). Ebenfalls in einem Tumormodell hatte eine Blockade des $\alpha_4\beta_1$ -Integrins (VLA-4) eine verminderte Adhäsion endothelialer Progenitorzellen in Bereichen stattfindender Neovaskularisation zur Folge, was auch in dieser Studie intravitalmikroskopisch untersucht wurde (JIN et al. 2006b).

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Bei der Pathophysiologie und -genese kardiovaskulärer Ereignisse wie beispielsweise Thrombose, Atherosklerose und Gefäßregeneration spielen Monozyten sowie Thrombozyten und Stammzellen eine herausragende Rolle (MAY et al. 2008). Um den Heilungsprozess zu fördern, müssen nach Aktivierung oder Schädigung des Gefäßendothels, therapeutische Ziele dahingehend verfolgt werden, möglichst schnell wieder einen antithrombogenen und anti-inflammatorischen Zustand der Gefäßwand zu schaffen. Dies bedeutet zum einen, Thrombozyten an einer überschießenden Adhäsion und Thrombusformation zu hindern. Zudem muss die Rekrutierung und Adhäsion von Monozyten und somit die Förderung inflammatorischer Gefäßwandveränderungen unterbunden werden. Die Adhäsion hämatopoetischer $CD34^+$ Stammzellen an verletzte Gefäßwandbereiche wird dagegen angestrebt, da diese Zellen durch ihr Potential, sich in reife endotheliale Vorläuferzellen differenzieren zu können, zur Wiederherstellung der Gefäßwandintegrität beitragen.

In den vorliegenden Untersuchungen galt es, die differenzielle Rolle der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 bezüglich der Adhäsion humaner Monozyten, Thrombozyten und $CD34^+$ Progenitorzellen *in vivo* zu evaluieren.

Auf Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe aufbauend, kann die vorliegende Arbeit mit Hilfe der Intravitalmikroskopie anhand zweier verschiedener Verletzungsmodelle der Maus zeigen, dass unter Einsatz eines blockierenden Antikörpers gegen den CXCR7-Rezeptor auf humanen Monozyten, Thrombozyten und $CD34^+$ Zellen, eine verminderte Adhäsion genannter Zelltypen an defektes und aktiviertes Endothel *in vivo* erreicht werden kann. Im Vergleich dazu sind die inhibierenden Effekte bezüglich der Adhäsion humaner Monozyten und Thrombozyten bei Blockade des CXCR4-Rezeptors in beiden Modellen weniger ausgeprägt. $CD34^+$ Zellen hingegen gehen im Carotismodell sowie im Darmmodell, auch unter Verwendung von anti-CXCR4 eine geringere Bindung mit der Gefäßwand ein.

Der Chemokinrezeptor CXCR7 stellt somit ein wertvolles Werkzeug dar, die Adhäsion humaner Monozyten, Thrombozyten und CD34⁺ Zellen künftig zu beeinflussen.

Aufgrund der Möglichkeit, eine Inhibition der Adhäsion humaner Monozyten und Thrombozyten über Beeinflussung des CXCR7-Rezeptors zu erreichen, besteht die Aussicht, thrombogenen und inflammatorischen Vorgängen sowie atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen entgegenzuwirken. Die Frage nach der pathophysiologischen Bedeutung des CXCR7 Rezeptors für die Thrombozytenaggregation sowie dem Einfluss dieses Rezeptors auf die Differenzierung von Monozyten in Schaumzellen, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Mit dem Wissen, dass sich die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 an der Regulation der Adhäsion humaner CD34⁺ Stammzellen beteiligen und zudem gemeinsam mit dem Chemokinligand SDF-1 für die Differenzierung endothelialer Progenitorzellen in Endothelzellen erforderlich sind, können Strategien entwickelt werden, Reparaturmechanismen an der Gefäßwand voranzutreiben.

Die Adhäsion von Thrombozyten, Monozyten und Progenitorzellen an die Gefäßwand beeinflusst die Entwicklung und den Verlauf der Atherosklerose, Thrombose und Geweberegeneration. Das Chemokin SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), welches bei einem Gewebeschaden wie beispielsweise dem akuten Myokardinfarkt freigesetzt wird, gilt als starkes Chemoattraktant für Thrombozyten, Progenitorzellen und Leukozyten. Thrombozyten spielen bei der Pathophysiologie der Thrombose und Inflammation eine maßgebliche Rolle. Dabei wird die Aktivierung, Aggregation, Adhäsion und Migration von Thrombozyten durch das bei Entzündung freigesetzte SDF-1 induziert. Die Gewebe- sowie die Gefäßregeneration erfordern die feste Bindung von im Körper zirkulierenden Progenitorzellen an die Gefäßwand und deren nachfolgende Differenzierung in Endothelzellen. Hierbei steuern Thrombozyten gemeinsam mit SDF-1 den Prozess der Rekrutierung von CD34⁺ Progenitorzellen an verletzte Gefäßwandbereiche. Zunächst galt CXCR4 als alleiniger Chemokinrezeptor für den Chemokinliganden SDF-1. Vor einiger Zeit wurde jedoch ein zweiter SDF-1-Rezeptor namens CXCR7 entdeckt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der differentiellen Rolle der Chemokinrezeptoren CXCR7 und CXCR4 für die Adhäsion humaner Thrombozyten, Monozyten und Progenitorzellen an Gefäßdefekte *in vivo*. Die Untersuchungen erfolgten mit Hilfe der Intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Es kamen zwei unterschiedliche Verletzungsmodelle an C57Bl/6J Mäusen zum Einsatz: Ein ligaturinduziertes Verletzungsmodell der Arteria carotis communis und ein Ischämie-/Reperusionsmodell des Dünndarms. Vor der intravenösen Applikation wurden die fluoreszenzmarkierten Zellen mit einem blockierenden Antikörper gegen CXCR7 oder CXCR4 beziehungsweise mit der entsprechenden Isotypkontrolle IgG₁/IgG_{2B} vorinkubiert.

Der Einfluss von CXCR7 auf die Adhäsion von Thrombozyten: Die Vorinkubation von Thrombozyten mit einem blockierenden Antikörper gegen CXCR7, nicht jedoch eine Vorbehandlung mit anti-CXCR4 oder der entsprechenden Isotypkontrolle IgG₁/IgG_{2B}, führte zu einer signifikant verminderten Adhäsion transient und fest adhärenter Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand der Arteria carotis ($p \leq 0.05$). Im Ischämie-Reperusionsmodell hatte die Vorinkubation mit anti-CXCR7, nicht jedoch mit anti-CXCR4 oder mit einer der

Isotypkontrollen IgG₁/IgG_{2B}, eine herabgesetzte Adhäsion fest adhärenter Thrombozyten in den mesenterialen Gefäßen des Dünndarms zur Folge.

Der Einfluss von CXCR7 auf die Adhäsion von Monozyten: Eine Vorbehandlung von Monozyten mit anti-CXCR7, nicht jedoch mit anti-CXCR4 oder mit einer der entsprechenden Isotypkontrollen IgG₁/IgG_{2B}, führte zu einer verminderten Adhäsion transient und fest adhärenter Monozyten an die verletzte Gefäßwand der Arteria carotis. Dagegen hatte im Ischämie-/Reperusionsmodell die Vorinkubation sowohl mit anti-CXCR7 als auch mit anti-CXCR4, nicht jedoch mit einer der Isotypkontrollen IgG₁/IgG_{2B}, eine herabgesetzte Adhäsion von Monozyten in den mesenterialen Gefäßen des Dünndarms zur Folge.

Der Einfluss von CXCR7 auf die Adhäsion von Progenitorzellen: Eine signifikant verminderte Adhäsion fest adhärenter Progenitorzellen an die verletzte Gefäßwand der Arteria carotis konnte nach Vorinkubation sowohl mit anti-CXCR7 als auch mit anti-CXCR4, jedoch nicht unter Einsatz einer der entsprechenden Isotypkontrollen IgG₁/IgG_{2B}, beobachtet werden ($p \leq 0.05$ für beide). Ein ähnliches Ergebnis ergab sich in den mesenterialen Gefäßen des Dünndarms nach Ischämie/Reperfusion, wobei eine verminderte Adhäsion von Progenitorzellen nach Vorinkubation mit anti-CXCR4 oder anti-CXCR7 zustande kam, nicht jedoch nach Vorbehandlung mit IgG₁ oder IgG_{2B} ($p \leq 0.05$ für beide).

Zusammenfassend liefern die Untersuchungen dieser Arbeit folgendes neues Ergebnis: Der CXCR7-Rezeptor stellt einen Regulator der SDF-1 vermittelten Adhäsion humaner Thrombozyten, Monozyten und CD34⁺ Progenitorzellen an Gefäßwanddefekte *in vivo* dar. Dieser Mechanismus ist vermutlich an der Pathophysiologie von inflammatorischen Gefäßwandveränderungen und bei der Gefäßregeneration beteiligt. Zukünftig können auf Grundlage dieser Erkenntnisse möglicherweise neue Strategien entwickelt werden, um die Adhäsion humaner Thrombozyten, Monozyten und Progenitorzellen zu beeinflussen und somit modulierend in die Pathophysiologie von entzündlichen Krankheiten einzugreifen.

6 SUMMARY**The differential role of the chemokine receptors CXCR7 and CXCR4 on the adhesion of humane platelets, monocytes and CD34⁺ progenitor cells at site of vascular injury in vivo**

The adhesion of platelets, monocytes and progenitor cells on vascular wall initiates and promotes atherosclerosis, thrombosis and tissue regeneration. The chemokine SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), expressed during tissue damage such as myocardial infarction, is a powerful chemoattractant for platelets, progenitor cells and leukocytes. Platelets play a pivotal role in both thrombosis and inflammation, and SDF-1 released at sites of inflammation induces platelet activation, aggregation, adhesion and migration. Tissue healing and vascular regeneration require firm adhesion of circulating progenitor cells to the vascular wall and their further differentiation into endothelial cells. Platelets and SDF-1 regulate domiciliation of CD34⁺ progenitor cells at areas of vascular injury. Until recently, CXCR4 was thought to be a canonical chemokine receptor for the SDF-1 ligand. However, a second SDF-1 receptor, the CXCR7, has been recently discovered.

In this work we investigated the differential role of CXCR7 and CXCR4 on human platelet/monocyte/progenitor cell adhesion in areas of vascular injury with the help of intravital fluorescence microscopy *in vivo*. Two different injury models in C57Bl/6J mice were used: a ligature induced carotid artery injury model and an ischemia/reperfusion model of the small intestine. The fluorescence labelled cells were preincubated with a blocking mAb either to CXCR7 or CXCR4 or control- IgG₁/IgG_{2B} and injected intravenously.

Role of CXCR7 on platelet adhesion: Preincubation of platelets with a blocking mAb to CXCR7, but not with control-IgG₁/IgG_{2B} or anti-CXCR4, resulted in a significantly decreased adhesion of transient and firm adherent platelets to the injured vessel wall of the carotid artery ($p \leq 0.05$). Preincubation of platelets with a neutralizing anti-CXCR7, but not with control-IgG₁/IgG_{2B} or anti-CXCR4, resulted in decreased adhesion of firm adherent platelets in the microvasculature of the small intestine after ischemia/reperfusion injury.

Role of CXCR7 on monocyte adhesion: Preincubation of monocytes with a blocking mAb to CXCR7, but not with control-IgG₁/IgG_{2B} or anti-CXCR4, resulted in a decreased adhesion of transient and firm adherent monocytes to the injured vessel wall of the carotid artery.

Preincubation of monocytes with either anti-CXCR7 or anti-CXCR4, but not with control IgG₁ or IgG_{2B}, respectively, resulted in decreased adhesion of monocytes in the microcirculation of the small intestine after ischemia/reperfusion injury.

Role of CXCR7 on progenitor cell adhesion: Preincubation of CD34⁺ cells either with anti-CXCR7 or anti-CXCR4, but not with control IgG₁ or IgG_{2B}, respectively, resulted in significantly decreased adhesion of firm adherent progenitor cells to the injured vessel wall of the carotid artery (p<0.05 for both). In a similar manner, preincubation of CD34⁺ cells with either anti-CXCR7 or anti-CXCR4, but not with control IgG₁ or IgG_{2B}, respectively, resulted in decreased adhesion of progenitor cells in the microcirculation of the small intestine after ischemia/reperfusion injury.

The major novel finding of the present study is: CXCR7 expressed on human platelets, monocytes and CD34⁺ progenitor cells regulates SDF-1 mediated cell adhesion in areas of vascular injury *in vivo*, a mechanism which may be involved in vascular inflammation and regeneration. Based on these insights new strategies could be developed in the future to influence the adhesion of human platelets, monocytes and progenitor cells via CXCR7 modulating the pathophysiologie of inflammatory diseases.

ABBOTT JD, HUANG Y, LIU D, HICKEY R, KRAUSE DS, GIORDANO FJ (2004).
Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury.
Circulation 110, 3300-3305.

ABI-YOUNES S, SI-TAHAR M, LUSTER AD (2001).
The CC chemokines MDC and TARC induce platelet activation via CCR4.
Thromb Res 101, 279-289.

AIUTI A, WEBB IJ, BLEULC, SPRINGER T, GUTIERREZ-RAMOS JC (1997).
The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood.
J Exp Med 185, 111-120.

ALKAHATIB G, COMBADIÈRE C, BRODER CC, FENG Y, KENNEDY PE, MURPHY PM, BERGER EA (1996).
CC CKRS: aRANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1.
Science 272, 1955-1958.

ALON R, KASSNER PD, CARR MW, FINGER EB, HEMLER ME, SPRINGER TA (1995).
The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1.
J Cell Biol 128, 1243-1253.

ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, WITZENBICHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM (1997).
Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.
Science 275, 964-967.

ASKARI AT, UNZEK S, POPVIC ZB, GOLDMANN CK, FORUDI F, KIEDROWSKI M, ROVNER A, ELLIS SG, THOMAS JD, DICORLETO PE, TOPOL EJ, PENN MS (2003).
Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy.
Lancet 362, 697-703.

ASSMUS B, HONOLD J, SCHACHINGER V, BRITTEN M, FISCHER-RASOKAT U, LEHMANN R, TEUPE C, PISTORIUS K, MARTIN H, ABOLMAALI ND, TONN T, DIMMELER S, ZEIHNER AM (2006).
Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction.
N Engl J Med 355, 1222-1232.

AUTELITANO DJ (1998).
Cardiac expression of genes encoding putative adrenomedullin/calcitonin related peptide receptors.
Biochem Biophys Res Commun 250, 689-693.

- BAGGIOLINI M (1998).
Chemokines and leukocyte traffic.
Nature 392, 565-568.
- BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B (1997).
Human chemokines: an update.
Annu Rev Immunol 15, 675-705.
- BAGRI A, GURNEY T, HE X, ZOU YR, LITTMAN DR, TESSIER-LAVIGNE M, PLEASURE SJ (2002).
The chemokine SDF-1 regulates migration and dentate granule cells.
Development 129, 4249-4260.
- BALABANIAN K, LAGANE B, INFANTINO S, CHOW KY, HARRIAGUE J, MOEPPS B, ARENZANAN-SEISDEDOS F, THELEN M, BACHELERIE F (2005).
The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes.
J Biol Chem 280, 35760-35766.
- BANISADR G, SKRZYDELSKI D, KITABGI P, ROSTENE W, PARSADANIAN TZ SM (2003).
Highly regionalized distribution of stromal cell-derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons.
Eur J Neurosci 18, 1593-1606.
- BAZAN JF, BACON KB, HARDIMAN G, WANG W, SOO K, ROSSI D, GREAVS DR, ZLOTNIK A, SCHALL TJ (1997).
A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.
Nature 385, 640-644.
- BECKER BF, HEINDL B, KUPATT C, ZAHLER S (2000).
Endothelial function and hemostasis.
Z Kardiol 89, 160-167.
- BERTOLINI F, DELL'AGNOLA C, MANCUSO P, RABASCIO C, BURLINI A, MONESTIROLI S, GOBBI A, PRUNERI G, MARTINELLI G (2002).
CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma.
Cancer Res 62, 3106-3112.
- BLEUL CC, FARZAN M, CHOE H, PAROLIN C, CLARK-LEWIS I, SODROSKI J, SPRINGER TA (1996b).
The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry.
Nature 383, 829-833.
- BLEUL CC, FUHLBRIGGE RC, CASASNOVAS JM, AIUTI A, SPRINGER TA (1996a).
A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1).
J Exp Med 184, 1101-1109.

BOISVERT WA, ROSE DM, JOHNSON KA, FUENTES ME, LIRA SA, CURTISS LK, TERKELTAUB RA (2006).

Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO- α in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression.

Am J Pathol 168, 1385-1395.

BOKOCH GM (1995).

Chemoattractant signaling and leukocyte activation.

Blood 86, 1649-1660.

BOLDAJIPOUR B, MAHABALESHWAR H, KARDASH E, REICHMANN-FRIED M, BLASER H, MININA S, WILSON D, XU Q, RAZ E (2008).

Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration.

Cell 132, 463-473.

BORING L, GOSLING J, CLEARY M, CHARO IF (1998).

Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis.

Nature 394, 894-897.

BOSCO MC, PUPPO M, SANTANGELO C, ANFOSSO L, PFEFFER U, FARDIN P, BATTAGLIA F, VARELIO L (2006).

Hypoxiamodifies the transcriptome of primary human monocytes: modulation of novel immune-related genes and identification of CC-chemokine ligand 20 as a new hypoxia-inducible gene.

J Immunol 177, 1941-1955.

BRANDT E, LUDWIG A, PETERSEN F, FLAD HD (2000).

Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games.

Immunol Rev 177, 204-216.

BURNS JM, SUMMERS BC, WANG Y, MELIKIAN A, BERAHOVICH R, MIAO Z, PENFOLD ME, SUNSHINE MJ, LITTMAN DR, KUO CJ, WEI K, McMASTER BE, WRIGHT K, HOWARD MC, SCHALL TJ (2006).

A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development.

J Exp Med 203, 2201-2213.

CAMPBELL DJ, KIM CH, BUTCHER EC (2003).

Chemokines in the systemic organization of immunity.

Immunol Rev 195, 58-71.

CAMPBELL JJ, HEDRICK J, ZLOTNIK A, SIANI MA, THOMPSON DA, BUTCHER EC (1998).

Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions.

Science 279, 381-404.

CANTLEY L (2005).

Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule.

Nat Clin Pract Nephrol 1, 22-32.

CELERMAJER DS (1997).

Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible?

J Am Coll Cardiol 30, 325-333.

CERADINI DJ, KULKARNI AR, CALLAGHAM MJ, TEPPER OM, BASTIDAS N, KLEINMAN ME, CAPLA JM, GALIANO RD, LEVINE JP, GURTNER GC (2004).

Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1.

Nat Med 10, 858-864.

CHAN JY, WATT SM (2001).

Adhesion receptors on haematopoietic progenitor cells.

Br J of Haematol 112, 541-557.

CHANDRASEKAR B, BYSANI S, MUMMIDI S (2004).

CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Atk, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation.

J Biol Chem 279, 3188-3196.

CHAVAKIS E, AICHER A, HEESCHEN C, SASAKI K, KAISER R, MAKHFI NE, URBICH C, PETERS T, SCHARFFETTER-KOCHANKE K, ZEIHNER AM, CHAVAKIS T, DIMMELER S. (2005).

Role of β 2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells.

J Exp Med 201, 63-72.

CHEN Y, LUI VC, ROOIJEN NV, TAM PK (2004).

Depletion of intestinal resident macrophages prevents ischaemia reperfusion injury in gut.

Gut 53, 1772-1780.

CHEN ZW, ZHOU P, HO DD, LANDAU NR, MARX PA (1997).

Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry.

J Virol 71, 2705-2714.

CHO HJ, SHASKIN P, GLEISSNER CA, DUNSON D, JAIN N, LEE JK, MILLER Y, LEY K (2007).

Induction of dendritic cell like phenotype in macrophages during foam cell formation.

Physiol Genomics 29, 149-160.

CHOE H, FARZAN M, SUN Y, SULLIVAN N, ROLLINS B, PONATH PD, WU LJ, MACKAY CR, LaROSA G, NEWMAN W, GERARD N, GERARD C, SODROSKI J (1996).

The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates.

Cell 85, 1135-1148.

CLARK-LEWIS I, DEWALD B, GEISER T, MOSER B, BAGGIOLINI M (1993).

Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg.

Proc Natl Acad Sci 90, 3574-3577.

- CLEMETSON JM, POLGAR J, MAGNENAT E, WELLS TNC, CLEMETSON KJ (1999).
The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer cells.
Biol Chem 274, 29019-29024.
- CLEMETSON KJ, CLEMETSON JM, PROUDFOOT AE, POWER CA, BAGGIOLINI M, WELLS TNC (2000).
Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4 and CXCR4 chemokine.
Blood 96, 4046-4054.
- COLE KE, STRICK CA, PARADIS TJ, OGBORNE KT, LOETSCHER M, GLADUE RP, LIN W, BOYD JG, MOSER B, WOOD DE, SAHAGAN BG, NEOTE K (1998).
Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ERL CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3.
J Exp Med 187, 2009-2021.
- COMBADIÈRE C, POTTEAUX S, GAO JL, ESPOSITO B, CASANOVA S, LEE EJ, DEBRE P, TEDGUI A, MURPHY PM, MALLAT Z (2003).
Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice.
Circulation 107, 1009-1016.
- COMERFORD I, MILASTA S, MORROW V, MILLIGAN G, NIBBS R (2006).
The chemokine receptor CCX-CKR mediates effective scavenging of CCL19 in vitro.
Eur J Immunol 36, 1904-1916.
- COOK JS, WOLSING DH, LAMEH J, OLSON CA, CORREA PE, SADEE W, BLUMENTHAL EM, ROSENBAUM JS (1992).
Characterization of the RDC1 gene which encodes the canine homolog of a proposed human VIP receptor. Expression does not correlate with an increase in VIP binding sites.
FEBS Lett 300, 149-152.
- COSTELLO CM, HOWELL K, CAHILL E, McBRYAN J, KÖNIGSHOFF M, EICKELBERG O, GAINE S, MARTIN F, McLOUGHLIN P (2008).
Lung-selective gene responses to alveolar hypoxia: potential role for the bone morphogenetic antagonist gremlin in pulmonary hypertension.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295, L272-84.
- CRUMP MP, GONG JH, LOETSCHER P, RAJARATHNAM K, AMARA A, ARENZANA-SEISDEDOS F, VIRELIZIER JL, BAGGIOLINI M, SYKES BD, CLARK-LEWIS I (1997).
Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1.
EMBO J 16, 6996-7001.
- CUEILLE C, PIDOUX E, DeVERNEJOU MC, VENTURA-CLAPIER R, GAREL JM (2002).
Increased myocardial expression of RAMP1 and RAMP3 in rats with chronic heart failure.
Biochem Biophys Res Commun 294, 340-346.

- CYSTER JG (1999a).
Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs.
Science 286, 20898-2102.
- CYSTER JG (1999b).
Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs.
J Exp Med 189, 447-450.
- DALAKAS E, NEWSOME PN, HARRISON DJ, PLEVRIS JN (2005).
Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury.
FASEB J 19, 1225-1231.
- DAMBLY-CHAUDIÈRE C, CUBEDO N, GHYSEN A (2007).
Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1.
BMC Dev Biol 29, 7:23.
- DAUB K, LANGER H, SEIZER P, STELLOS K, MAY AE, GOYAL P, BIGALKE B, SCHÖNBERGER T, GEISLER T, SIEGEL-AXEL D, OOSTENDORP RA, LINDEMANN S, GAWAZ M (2006).
Platelets induce differentiation of human CD34⁺ progenitor cells into foam cells and endothelial cells.
FASEB J 20, E1935-E1944.
- DAVID NB, SAPÈDE D, SAINT-ETIENNE L, THISSE C, THISSE B, DAMBLY-CHAUDIÈRE C, ROSA FM, GHYSEN A (2002).
Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1.
Proc Natl Acad Sci USA 99, 16297-16302.
- DAWSON TC, KUZIEL WA, OSAHAR TA, MAEDA N (1999).
Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in a apolipoprotein E-deficient mice.
Atherosclerosis 143, 205-211.
- DE LA LUZ SIERRA M, YANG F, NARAZAKI M, SALVUCCI O, DAVIS D, YARCHOAN R, ZHANG HH, FALES H, TOSATO G (2004).
Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity.
Blood 103, 2452-2459.
- DEUEL TF, SENIOR RM, CHANG D, GRIFFIN GL, HEINRIKSSON RL, KAISER ET (1981).
Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes.
Proc Natl Acad Sci USA 78, 4584-4587.
- DEVINE SM, FLOMENBERG N, VESOLE DH, LIESVELD J, WEISDORF D, BADEL K, CALANDRA G, DiPERSIO JF (2004).
Rapid mobilization of CD34⁺ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma.
J Clin Oncol 22, 1095-1102.

- DIACOVO TG, DeFOUGEROLLES AR, BAINTON DF, SPRINGER TA (1994).
A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2.
J Clin Invest 94, 1243-1251.
- DIETRICH J, KEMPERMANN G (2006).
Role of endogenous neural stem cells in neurological disease and brain repair.
Adv Exp Med Biol 557, 191-220.
- DIMMELER S, ZEIHNER AM, SCHNEIDER MD (2005).
Unchain my heart: scientific foundations of cardiac repair.
J Clin Invest 115, 572-583.
- DOITSIDOU M, REICHMAN-FRIED M, STEBLER J, KÖPRUNNER M, DÖRRIES J, MEYER D, ESGUERRA CV, LEUNG T, RAZ E (2002).
Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1.
Cell 111, 647-659.
- DZAU VJ, GIBBONS GH, COOKE JP, OMOIGUI N (1993).
Vascular biology and medicine in the 1990s: scope, concepts, potentials, and perspectives.
Circulation 87, 705-719.
- EHLERS R, USTINOV V, CHEN Z, ZHANG X, RAO R, LUSCINSKAS FW, LOPEZ J, PLOW E, SIMON DI (2003).
Targeting platelet-leukocyte interactions: identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor glycoprotein Ib α .
J Exp Med 198, 1077-1088.
- ELSTAD MR, LA PINE TR, COWLEY FS, McEVER RP, McINTYRE TM, PRESCOTT SM, ZIMMERMANN GA (1995).
P-selectin regulates platelet-activating factor synthesis and phagocytosis by monocytes.
J Immunol 155, 2109-2122.
- ENGELHARDT W.v. (2000).
Kreislauf: Allgemeine Aufgaben der Kreislaufsysteme und Aufbau der Gefäßwände.
In: Engelhardt W.v., Breves G.: Physiologie der Haustiere. Aufl. 1, Enke Verlag, Stuttgart, 171-189.
- ERDEL M, LAICH A, UTERMANN G, WERNER ER, WERNER-FELMAYER G (1998).
The human gene encoding SCYB9B, a putative novel CXC chemokine, maps to human chromosome 4q21 like the closely related genes for MIG (SCYB9) and INP10 (SCYB10).
Cytogenet Cell Genet 81, 271-272.
- EVA C, SPRENGEL R (1993).
A novel putative G protein-coupled receptor highly expressed in lung and testis.
DNA Cell Biol 12, 393-399.
- FALK E (1991).
Coronary thrombosis: Pathogenesis and clinical manifestations.
Am J Cardiol 68, 28B-38B.

FEDERSPIEL B, MELHADO IG, DUNCAN AMV, DELANEY A, SCHAPPERT K, CLARK-LEWIS I, JIRIK FR (1993).

Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen.

Genomics 16, 707-712.

FENG Y, BRODER CC, KENNEDY PE, BERGER EA (1996).

HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor.

Science 272, 872-877.

FERNANDEZ EJ, LOLIS E (2002).

Structure, function and inhibition of chemokines.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 42, 469-499.

FERRARI R, CECONI C, CURELLO S, GUARNIERI C, CALDARERA CM, ALBERTINI A, VISIOLI O (1985).

Oxygen-mediated myocardial damage during ischemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity.

J Mol Cell Cardiol 17, 937-945.

FIBBE WE, PRUIJT JF, VAN KOOYK Y, FIGDOR CG, OPDENAKKER G, WILLEMZE R (2000).

The role of metalloproteinases and adhesion molecules in interleukin-8-induced stem cell mobilization.

Semin Hematol 37, 19-24.

FITZGERALD DJ, ROY L, CATELLA F, FITZGERALD GA (1986).

Platelet activation in unstable coronary disease.

N Engl J Med 315, 983-989.

FORMAN MB, VIRMANI R, PUETT DW (1990).

Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury.

Circulation 81 (3 Suppl), IV 69-78.

FREDRIKSSON R, LAGERSTRÖM MC, LUNDIN LG, SCHIÖTH HB (2003).

The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.

Mol Pharmacol 63, 1256-1272.

FU S, LIESVELD J (2000).

Mobilization of hematopoietic stem cells.

Blood Rev 14, 205-218.

FUJIYAMA S, AMANO K, UEHIRA K, YOSHIDA M, NISHIWAKI Y, NOZAWA Y, JIN D, TAKAI S, MIYAZAKI M, EGASHIRA K, IMADA T, IWASAKA T, MATSUBARA H (2003).

Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells.

Circ Res 93, 980-1009.

FUSTER V, BADIMON JJ, CHESEBRO JH (1998).

Atherothrombosis: mechanisms and clinical therapeutic approaches.

Vascular Medicine 3, 231-239.

FUSTER V, BADIMON L, BADIMON J, CHESEBRO JH (1992).

The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes.

N Engl J Med 326, 242-250.

GAWAZ M (1999).

Das Blutplättchen.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1-41.

GAWAZ M (2004).

Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium.

Cardiovasc Res 61, 498-511.

GAWAZ M, KONRAD I, HAUSER AI, SAUER S, LI Z, WESTER HJ, BENDEL FM, SCHWAIGER M, SCHOMIG A, MASSBERG S, HAUBNER R (2005a).

Non-invasive imaging of glycoprotein VI binding to injured arterial lesions.

Thromb Haemost 93, 910-913.

GAWAZ M, LANGER H, MAY AE (2005b).

Platelets in inflammation and atherogenesis.

J Clin Invest 115, 3378-3384.

GAWAZ M, NEUMANN FJ, DICKFELD T, KOCH W, LAUGWITZ KL, ADELSBERGER H, LANGENBRINK K, PAGE S, NEUMEIER D, SCHOMIG A, BRAND K (1998).

Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells.

Circulation 98, 1164-1171.

GAWAZ MP, LOFTUS JC, BAJT ML, FROJMOVIC MM, PLOW EF, GINSBERG MH (1991).

Ligand bridging mediates integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions.

J Clin Invest 88, 1128-1134.

GEAR AR, CAMERINI D (2003).

Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation and host defense.

Microcirculation 10, 335-350.

GEAR AR, SUTTITANAMONGKOL S, VIISOREANU D, POLANOWSKA-GRABOWSKA RK, RAHA S, CAMERINI D (2001).

Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC and SDF-1 to stimulate platelet function.

Blood 97, 937-945.

GEORGE JN (2000).

Platelets.

Lancet 355, 1531-1539.

GERRITS H, VAN INGEN SCHENAU DS, BAKKER NE, VAN DISSELDORP AJ, STRIK A, HERMENS LS, KOENEN TB, KRAJNC-FRANKEN MA, GOSSEN JA (2008).
Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice.
Genesis 46, 235-245.

GERSZTEN RE, GARCIA-ZAPEDA EA, LIM YC, YOSHIDA M, DING HA, GIMBRONE MA jr., LUSTER AD, LUSCINSKAS FW, ROSENZWEIG A (1999).
MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.
Nature 398, 718-723.

GIANCARLO B, SILVANO S, ALBERT Z, MANTOVANI A, ALLAVENA P (1996).
Migratory response of human natural killer cells to lymphotactin.
Eur J Immunol 26, 3238-3241.

GIBBONS GH, DZAU VJ (1994).
The emerging concept of vascular remodeling.
N Engl J Med 330, 1431-1438.

GINSBERG MH, LOFTUS JC (1995).
Platelet integrins.
Thromb Haemost 74, 352-359.

GÖBEL TH, KASPERS B (2000).
Immunabwehr und Blutgruppen: Angeborene Abwehrmechanismen, Zellen des angeborenen Immunsystems.
In: Engelhardt W.v., Breves G.: Physiologie der Haustiere. Aufl. 1, Enke Verlag, Stuttgart, 217-218.

GOLDMANN T, DRÖMANN D, RADTKE J, MARWITZ S, LANG DS, SCHULTZ H, VOLLMER E (2008).
CXCR7 transcription in human non-small cell lung cancer and tumor-free lung tissues; possible regulation upon chemotherapy.
Virchows Arch 452, 347-348.

GONZÁLEZ-AMARO R, SÁNCHEZ-MADRID F (1999).
Cell adhesion molecules: selectins and integrins.
Crit Rev Immunol 19, 389-429.

GOSLING J, SLAYMAKER S, GU L, TSENG S, ZLOT CH, YOUNG SG, ROLLINS BJ, CHARO IF (1999).
MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B.
J Clin Invest 103, 773-778.

GUO Y, HANGOC W, BIAN H, PELUS LM, BROXMEYER HE (2005).
SDF-1/CXCL12 enhances survival and chemotaxis of murine embryonic stem cells and production of primitive and definitive hematopoietic progenitor cells.
Stem Cells 23, 1324-1332.

- GUPTA SK, LYSKO PG, PILLARISETTI K, OHLSTEIN E, STADEL JM (1998).
Chemokine receptors in human endothelial cells: functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines.
J Biol Chem 273, 4282-4287.
- GUPTA SK, PILLARISETTI K, THOMAS RA, AIYAR N (2001).
Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1 α : implications for development of selective CXCR4 antagonists.
Immunol Lett 78, 29-34.
- HARALDSEN G, ROT A (2006).
Coy decoy with a new ploy: interceptor controls the levels of homeostatic chemokines.
Eur J Immunol 36, 1659-1661.
- HARTMANN TN, BURGER JA, GLODEK A, FUJII N, BURGER M (2005).
CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells.
Oncogene 24, 4462-4471.
- HARTMANN TN, GRABOVSKY V, PASVOLSKY R, SHULMAN Z, BUSS EC, SPIEGEL A, NAGLER A, LAPIDOT T, THELEN M, ALON R (2008).
A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34⁺ cells.
J Leukoc Biol 84, 1130-1140.
- HEARSE DJ, MAXWELL L, SALDANHA C, GAVIN JB (1993).
The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and protection.
J Mol Cell Cardiol 25, 759-800.
- HEESEN M, BERMAN MA, CHAREST A, HOUSMAN D, GERARD C, DORF ME (1998).
Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1.
Immunogenetics 47, 364-370.
- HENKE J, ERHARDT W (2004).
Speziesspezifische Anästhesie-Nager.
In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J: Anästhesie & Analgesie beim Klein- und Heimtier. Schattauer Verlag, Stuttgart, 642-663.
- HICKS C, WONG R, MANOHARAN A, KWAN YL (2007).
Viable CD34⁺/CD133⁺ blood progenitor cell dose as a predictor of haematopoietic engraftment in multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation.
Ann Hematol 86, 591-598.
- HILL JM, ZALOS G, HALCOX JP, SCHENKE WH, WACLAWIW MA, QUYYUMI AA, FINKEL T (2003).
Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.
N Engl J Med 348, 593-600.

HILL WD, HESS DC, MARTIN-STUDDARD A, CAROTHERS JJ, ZHENG J, HALE D, MAEDA M, FAGAN SC, CARROLL JE, CONWAY SJ (2004).

SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury.

J Neuropathol Exp Neurol 63, 84-96.

HORUK R (2001).

Chemokine receptors.

Cytokine Growth factor Rev 12, 313-335.

HRISTOV M, ERL W, WEBER PC (2003).

Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 23, 1185-1189.

HRISTOV M, ZERNECKE A, BIDZHEKOV K, LIEHN EA, SHAGDARSUREN E, LUDWIG A, WEBER C (2007a).

Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to site of arterial injury.

Circ Res 100, 590-597.

HRISTOV M, ZERNECKE A, LIEHN EA, WEBER C (2007b).

Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury.

Thromb Haemost 98, 274-277.

HUNDELSHAUSEN P. v., KOENEN RR, SACK M, MAUSE FS, ADRIAENS W, PROUDFOOT AE, HACKENG TM, WEBER C (2005).

Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium.

Blood 105, 924-930.

HUNDELSHAUSEN P. v., WEBER KS, HUO Y, PROUDFOOT AE, NELSON PJ, LEY K, WEBER C (2001).

RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium.

Circulation 103, 1772-1777.

HUO Y, HAFEZI-MOGHADAM A, LEY K (2000).

Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions.

Circ Res 87, 153-209.

HUO Y, LEY K (2004).

Role of platelets in the development of atherosclerosis.

Trends Cardiovasc Med 14, 18-22.

HUO Y, LEY KF (2001).

Adhesion molecules and atherogenesis

Acta Physiol Scand 173, 35-43.

HUO Y, SCHOBER A, FORLOW SB, SMITH DF, HYMAN MC, JUNG S, LITTMAN DR, WEBER C, LEY K (2003).

Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E.

Nat Med 9, 61-107.

HUO Y, WEBER C, FORLOW SB, SPERANDIO M, THATTE J, MACK M, JUNG S, LITTMAN DR, LEY K (2001).

The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium.

J Clin Invest 108, 1307-1314.

HYNES RO (2002).

Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.

Cell 110, 673-687.

IMAI K, KOBAYASHI M, WANG J, SHINOBU N, YOSHIDA H, HAMADA J, SHINDO M, HIGASHINO F, TANAKA J, ASAKA M, HOSOKAWA M (1999).

Selective secretion of chemoattractants for hemopoietic progenitor cells by bone marrow endothelial cells: a possible role in homing of hemopoietic progenitor cells to bone marrow.

Br J Haematol 106, 905-911.

IMAI T, HIESHIMA K, HASKELL C, BABA M, NAGIRA M, NISHIMURA M, KAKIZAKI M, TAKAGI S, NOMIYAMA H, SCHALL TJ, YOSHIE O (1997).

Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion.

Cell 91, 521-530.

IMITOLA J, RADDASSI K, PARK KI, MUELLER FJ, NIETO M, TENG YD, FRENKEL D, LI J, SIDMAN RL, WALSH CA, SNYDER EY, KHOURY SJ (2004).

Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway.

Proc Natl Acad Sci USA 101, 18117-18122.

INFANTINO S, MOEPPS B, THELEN M (2006).

Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells.

J Immunol 176, 2197-2207.

IWAKIRI S, MINO N, TAKAHASHI T, SONOBE M, NAGAI S, OKUBO K, WADA H, DATE H, MIYAHARA R (2009).

Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer.

Cancer 115, 2580-2593.

JANOWSKI M (2009).

Functional diversity of SDF-1 splicing variants.

Cell Adh Migr 3, 243-249.

JENNINGS RB, REIMER KA, HILL ML, MAYER SE (1981).

Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo.

Circ Res 49, 892-900.

JIN DK, SHIDO K, KOPP HG, PETIT I, SHMELKOV SV, YOUNG LM, HOOPER AT, AMANO H, AVECILLA ST, HEISSIG B, HATTORI K, ZHANG F, HICKLIN DJ, WU Y, ZHU Z, DUNN A, SALARI H, WERB Z, HACKETT NR, CRYSTAL RG, LYDEN D, RAFII S (2006).

Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4⁺ hemangiocytes.

Nat Med 12, 557-567.

JONES SW, BROCKBANK SM, MOBBS ML, LE GOOD NJ, SOMA-HADDRICK S, HEUZE AJ, LANGHAM CJ, TIMMS D, NEWHAM P, NEEDHAM MR (2006).

The orphan G-protein coupled receptor RDC1: evidence for a role in chondrocyte hypertrophy and articular cartilage matrix turnover.

Osteoarthritis Cartilage 14, 597-608.

JOOST P, METHNER A (2002).

Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a toll for the prediction of orphan receptor ligands.

Genome Biol 3 0063.1-0063.16.

KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, GORDON R, TEPPER O, GRAVEREAUX E, PIECZEK A, IWAGURO H, HAYASHI SI, ISNER JM, ASAHARA T (2000).

Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects.

Circ Res 86, 1198-1202.

KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA-MOLL WM, SILVER M, KEARNEY M, LI T, ISNER JM, ASAHARA T (2000).

Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization.

Proc Natl Acad Sci USA 97, 3422-3427.

KAPLAN KL, BROEKMAN MJ, CHERNOFF A, LESZNIK GR, DRILLINGS M (1979).

Platelet alpha-granule proteins: studies on release and subcellular localization.

Blood 53, 604-618.

KELNER GS, KENNEDY J, BACON KB, KLEYENSTEUBER S, LARGAESPADA DA, JENKINS NA, COPELAND NG, BAZAN JF, MOORE KW, SCHALL TJ, et al. (1994).

Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine.

Science 266, 1395-1409.

KENNEDY J, KELNER GS, KLEYENSTEUBER S (1995).

Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin.

J Immunol 155, 203-209.

KIJIMA T, MAULIK G, MA PC, TIBALDI EV, TURNER RE, ROLLINS B, SATTTLER M, JOHNSON BE, SALGIA R (2002).

Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells.

Cancer Res 62, 6304-6311.

KIJOWSKI J, BAJ-KRZYWORZEKA M, MAJKA M, RECA R, MARQUEZ LA, CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU M, JANOWSKA WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ (2001).

The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells.

Stem Cells 19, 453-466.

KIM CH, BROXMEYER HE (1998).

In vitro behaviour of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment.

Blood 91, 100-110.

KING AG, HOROWITZ D, DILLON SB, LEVIN R, FARESE AM, MAC VITTIE TJ, PELUS LM (2001).

Rapid mobilization of murine hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties and evaluation of hematopoietic progenitor cell mobilization in rhesus monkeys by a single injection of SB-251353, a specific truncated form of the human CXC chemokine GRO β .

Blood 97, 1534-1542.

KLONER RA, GANOTE CE, JENNINGS RB (1974).

The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog.

J Clin Invest 54, 1496-1508.

KOCHER AA, SCHUSTER MD, BONAROS N, LIETZ K, XIANG G, MARTENS TP, KURLANSKY PA, SONDERMEIJER H, WITKOWSKI P, BOYLE A, HOMMA S, WANG SF, ITESCU S (2006).

Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines.

J Mol Cell Cardiol 40, 455-464.

KOGAKI S, SAWA Y, SANO T, MATSUSHITA T, OHATA T, KUROTOBI S, TOJO SJ, MATSUDA H, OKADA S (1999).

Selectin on activated platelets enhances neutrophil endothelial adherence in myocardial reperfusion injury.

Cardiovasc Res 43, 968-973.

KOLLET O, SHIVTIEL S, CHEN YQ, SURIAWINATA J, THUNG SN, DABEVA MD, KAHN J, SPIEGEL A, DAR A, SAMIRA S, GOICHBERG P, KALINKOVICH A, ARENZANA-SEISDEDOS F, NAGLER A, HARDAN I, REVEL M, SHAFRITZ DA, LAPIDOT T (2003).

HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver.

J Clin Invest 112, 160-169.

KORTESIDIS A, ZANNETTINO A, ISENMANN S, SHI S, LAPIDOT T, GRONTHOS S (2005).

Stromal derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells.

Blood 105, 3793-3801.

KOWALSKA MA, RATAJCZAK J, HOXIE J, BRASS LF, GEWIRTZ A, PONCZ M, RATAJCZAK MZ (1999).

Megakaryocyte precursors, megakaryocytes and platelets express the HIV co-receptor CXCR4 on their surface: determination of response to stromal-derived factor-1 by megakaryocytes and platelets.

Br J Haematol 104, 220-229.

KRONENWETT R, MARTIN S, HAAS R (2000).

The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells.

Stem Cells 18, 320-330.

KUANG Y, WU Y, JIANG H, WU D (1996).

Selective G protein coupling by C-C chemokine receptors.

J Biol Chem 271, 3975-3978.

KUCIA M, JANKOWSKI K, RECA R, WYSOCZYNSKI M, BANDURA L, ALLENDORF DJ, ZHANG J, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ (2004).

CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion.

J Mol Histol 35, 233-245.

KUCIA M, RECA R, MIEKUS K, WANZECK J, WOJAKOWSKI W, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ (2005).

Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis.

Stem Cells 23, 879-894.

KUCIA M, ZHANG YP, RECA R, WYSOCZYNSKI M, MACHALINSKI B, MAJKA M, ILDSTAD ST, RATAJCZAK J, SHIELDS CB, RATAJCZAK MZ (2006).

Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke.

Leukemia 20, 18-28.

KUZIEL WA, MORGAN SJ, DAWSON TC, GRIFFIN S, SMITHIES O, LEY K, MAEDA N (1997).

Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2.

Proc Natl Acad Sci USA 94, 12053-12058.

LANG P, BADER P, SCHUMM M, FEUCHTINGER T, EINSELE H, FÜHRER M, WEINSTOCK C, HANDGRETINGER R, KUCI S, MARTIN D, NIETHAMMER D, GREIL J (2004).

Transplantation of a combination of CD133⁺ and CD34⁺ selected progenitor cells from alternative donors.

Br J Haematol 124, 72-79.

LANGER H, CHAVAKIS T (2009).

Leukocyte-endothelial interactions in inflammation.

J Cell Mol Med 13, 1211-1220.

LANGER H, MAY AE, DAUB K, HEINZMANN U, LANG P, SCHUMM M, VESTWEBER D, MASSBERG S, SCHÖNBERGER T, PFISTERER I, HATZOPOULOS AK, GAWAZ M (2006).

Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro.

Circ Res 98, 2-10.

LANGER HF, DAUB K, BRAUN G, SCHÖNBERGER T, MAY AE, SCHALLER M, STEIN GM, STELLOS K, BUELTMANN A, SIEGEL-AXEL D, WENDEL HP, AEBERT H, ROECKEN M, SEIZER P, SANTOSO S, WESSELBORG S, BROSSART P, GAWAZ M (2007).

Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 27, 1463-1470.

LAPIDOT T, DAR A, KOLLET O (2005).

How do stem cells find their way home?.

Blood 106, 1901-1910.

LAPIDOT T, PETIT I (2002).

Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells.

Exp Hematol 30, 973-981.

LARSEN E, CELI A, GILBERT GE, FURIE BC, ERBAN JK, BONFANTI R, WAGNER DD, FURIE B (1989).

PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes.

Cell 59, 305-312.

LEFER AM, CAMPBELL B, SCALIA R, LEFER DJ (1998).

Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins.

Circulation 98, 1322-1328.

LEFKOWITZ RJ, SHENOY SK (2005).

Transduction of receptor signals by beta-arrestins.

Science 308, 512-517.

LESNIK P, HASKELL CA, CHARO IF (2003).

Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis.

J Clin Invest 111, 333-340.

LÉVESQUE JP, LEAVESLEY DI, NIUTTA S, VADAS M, SIMMONS PJ (1995).

Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins.

J Exp Med 181, 1805-1815.

LEVESQUE J-P, SIMMONS PJ (1999).

Cytoskeleton and integrin-mediated adhesion signaling in human CD34⁺ hemopoietic progenitor cells.

Exp Hematol 27, 579-586.

LEVESQUE JP, TAKAMATSU Y, NILSSON SK, HAYLOCK DN, SIMMONS PJ (2001).

Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor.

Blood 98, 1289-1297.

LEVOYE A, BALABANIAN K, BALEUX F, BACHELERIE F, LAGANE B (2009).

CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling.

Blood 113, 6085-6093.

LIANG Z, BROOKS J, WILLARD M, LIANG K, YOON Y, KANG S, SHIM H (2007).

CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway.

Biochem Biophys Res Commun 359, 716-722.

LIAO JK (1998).

Endothelium and acute coronary syndromes.

Clin Chem 44, 1799-1808.

LIBBY P (1998).

The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms.

Vascular Medicine 3, 225-229.

LIBBY P (2002).

Inflammation in atherosclerosis.

Nature 420, 868-874.

LIBERT F, PARMENTIER M, LEFORT A, DUMONT JE, VASSART G (1990).

Complete nucleotide sequence of a putative G protein coupled receptor: RDC1.

Nucleic Acids Res 18, 1917.

LIBERT F, PASSAGE E, PARMENTIER M, SIMONS MJ, VASSART G, MATTEI G (1991).

Chromosomal mapping of a A1 und A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor.

Genomics 11, 225-227.

LIBURA J, DRUKALA J, MAJKA M, TOMESCU O, NAVENOT JM, KUCIA M, MARQUEZ L, PEIPER SC, BARR FG, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ (2002).

CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion , chemotaxis, and adhesion.

Blood 100, 2597-2606.

LIEBICH H.-G (2004a).

Kreislaufsystem (Systema cardiovasculare et lymphovascular).

In: Liebich H.-G.: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Aufl. 4, Schattauer, Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 129-142.

LIEBICH H.-G (2004b).

Blut- und Blutzellbildung: Leukozyten, Monozyt.

In: Liebich H.-G.: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Aufl. 4, Schattauer, Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 152-154.

LIEBICH H.-G (2004c).

Blut- und Blutzellbildung: Leukozyten, Blutplättchen.

In: Liebich H.-G.: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Aufl. 4, Schattauer, Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 155-156.

LIEBICH H.-G (2004d).

Blut- und Blutzellbildung: Differenzierung der Blutzellen

In: Liebich H.-G.: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Aufl. 4, Schattauer, Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 144.

LIEHN EA, SCHOBER A, WEBER C (2004).

Blockade of keratinocyte-derived chemokine inhibits endothelial recovery and enhances plaque formation after arterial injury in ApoE-deficient mice.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 24, 1891-1896.

LOCATI M, TORRE YM, GALLIERA E, BONECCHI R, BODDULURI H, VAGO G, VECCHI A, MANTOVANI A (2005).

Silent chemoattractant receptors: D6 as decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines.

Cytokine Growth Factor Rev 16, 679-686.

LOETSCHER M, GEISER T, O'REILLY T, ZWAHLEN R, BAGGIOLINI M, MOSER B (1994).

Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes.

J Biol Chem 269, 232-237.

LOETSCHER P, CLARK-LEWIS I (2001).

Agonistic and antagonistic activities of chemokines.

J Leukoc Biol 6, 881-884.

LUO BH, CARMAN CV, SPRINGER TA (2007).

Structural basis of integrin regulation and signaling.

Annu Rev Immunol 25, 619-647.

LUSCINSKAS FW, KANSAS GS, DING H, PIZCUETA P, SCHLEIFFENBAUM BE, TEDDER TF, GIMBRONE MA jr (1994).

Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins.

J Cell Biol 125, 1417-1427.

LUSIS AJ (2000).

Atherosclerosis.

Nature 407, 233-241.

LUSTER A.D, ALON R, ANDRIAN U.H v. (2005).

Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets.

Nat Immunol 6, 1182-1190.

MA Q, JONES D, BORGHESANI PR, SEGAL RA, NAGASAWA T, KISHIMOTO T, BRONSON RT, SPRINGER TA (1998).

Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice.

Proc Natl Acad Sci USA 95, 9448-9453.

MADDEN SL, COOK BP, NACHT M, WEBER WD, CALLAHAN MR, JIANG Y, DUFAULT MR, ZHANG X, ZHANG W, WALTER-YOHRING J, ROULEAU C, AKMAEV VR, WANG CJ, CAO X, StMARTIN TB, ROBERTS BL, TEICHER BA, KLINGER KW, STAN RV, LUCEY B, CARSON-WALTER EB, LATERRA J, WALTER KA (2004).

Vascular gene expression in nonneoplastic and malignant brain.

Am J Pathol 165, 601-608.

MAJKA M, RATAJCZAK MZ (2006).

Biological role of the CXCR4-SDF-1 axis in normal humane hematopoietic cells.

Methods Mol Biol 332, 103-114.

MAKSYM RB, TARNOWSKI M, GRYMULA K, TARNOWSKA J, WYSOCZYNSKI M, LIU R, CZERNY B, RATAJCZAK J, KUCIA M, RATAJCZAK MZ (2009).

The role of stromal-derived factor-1. CXCR7 axis in development and cancer.

Eur J Pharm 625, 31-40.

MARLIN SD, SPRINGER TA (1987).

Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen1 (LFA-1).

Cell 51 (5), 813-909.

MASERI A, CREA F, CIANFLONE D (1992).

Myocardial ischemia caused by distal coronary vasoconstriction.

Am J Cardiol 70, 1602-1605.

MASSBERG S, BRAND K, GRÜNER S, PAGE S, MÜLLER E, MULLER I, BERGMEIER W, RICHTER T, LORENZ M, KONRAD I, NIESWANDT B, GAWAZ M (2002).

A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation.

J Exp Med 196, 887-896.

MASSBERG S, EISENMENGER S, ENDERS G, KROMBACH F, MESSMER K (1998a).

Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse.

Res Exp Med 198, 23-35.

MASSBERG S, ENDERS G, LEIDERER R, EISENMENGER S, VESTWEBER D, KROMBACH F, MESSMER K (1998b).

Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin.
Blood 92, 507-515.

MASSBERG S, GAWAZ M, GRÜNER S, SCHULTE V, KONRAD I, ZOHLNHÖFER D, HEINZMANN U, NIESWANDT B (2003a).

A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo.
J Exp Med 197, 41-49.

MASSBERG S, KONRAD I, BÜLTMANN A, SCHULZ C, MÜNCH G, PELUSO M, LORENZ M, SCHNEIDER S, BESTA F, MÜLLER I, HU B, LANGER H, KREMMER E, RUDELIUS M, HEINZMANN U, UNGERER M, GAWAZ M (2003b).

Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo.

Faseb J 18, 397-399.

MASSBERG S, KONRAD I, SCHÜRZINGER K, LORENZ M, SCHNEIDER S, ZOHLNHÖFER D, HOPPE K, SCHIEMANN M, KENNERKNECHT E, SAUER S, SCHULZ C, KERSTAN S, RUDELIUS M, SEIDL S, SORGE F, LANGER H, PELUSO M, GOYAL P, VESTWEBER D, EMAMBOKUS NR, BUSCH DH, FRAMPTON J, GAWAZ M (2006).

Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo.

J Exp Med 203, 1221-1233.

MAXWELL SR, LIP GY (1997).

Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options.

Int J Cardiol 58, 95-117.

MAY AE, KÄLSCH T, MASSBERG S, HEROUY Y, SCHMIDT R, GAWAZ M (2002).

Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells.

Circulation 106, 2111-2117.

MAY AE, NEUMANN FJ, SCHÖMIG A, PREISSNER KT (2000).

VLA-4 (alpha(4)beta(1)) engagement defines a novel activation pathway for beta(2) integrin-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor.

Blood 96, 506-513.

MAY AE, SEIZER P, GAWAZ M (2008).

Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 28, s5-10.

MAZZINGHI B, RONCONI E, LAZZERI E, SAGRINATI C, BALLERINI L, ANGELOTTI ML, PARENTE E, MANCINA R, NETTI GS, BECHERUCCI F, GACCI M, CARINI M, GESUALDO M, ROTONDI M, MAGGI E, LASAGNI L, SERIO M, ROMAGNANI S, ROMAGNANI P (2008).

Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells.

J Exp Med 205, 479-490.

McEVER RP (1994).

Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium.

Ann New York Acad Sci 714; 185-189.

MEHRABIAN M, DEMER LL, LUSIS AJ (1991).

Differential accumulation of intimal monocyte-macrophages relative to lipoproteins and lipofuscin corresponds to hemodynamic forces on cardiac valves in mice.

Arterioscler Thromb 4, 947-957.

MEIJER J, OGINK J, ROOS E (2008).

Effect of the chemokine receptor CXCR7 on proliferation of carcinoma cells in vitro and in vivo.

Br J Cancer 99, 493-501.

MELIKIAN AJ, BURNS JM, McMASTER BE, SCHALL T, WRIGHT JJ (2004).

Inhibitors of human tumor-expressed CCX CKR2.

Patent Cooperation Treaty application WO04058705 (15 July 2004) and USA patent publication US 20040170634 (2 September 2004).

MIAO Z, LUKER KE, SUMMERS BC, BERAHOVICH R, BHOJANI MS, REHEMTULLA A, KLEER CG, ESSNER JJ, NASEVICIUS A, LUKER GD, HOWARD MC, SCHALL TJ (2007).

CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature.

Proc Natl Acad Sci USA 104, 15735-15740.

MILLER-KASPRZAK E, JAGODZINSKI PP (2007).

Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair.

Arch Immunol Ther Exp 55, 247-259.

MOEPPS B, NUESSELER E, BRAUN M, GIERSECHIK P (2006).

A homolog of the human chemokine receptor CXCR1 is expressed in the mouse.

Mol Immunol 43, 897-914.

MOORE KL, STULTS NL, DIAZ S, SMITH DF, CUMMINGS RD, VARKI A, McEVER RP (1992).

Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells.

J Cell Biol 118, 445-456.

MOROI M, JUNG SM (1997).

Platelet receptors for collagen.

Thromb Haemost 78, 439-444.

- MOROI M, JUNG SM, OKUMA M, SHINMYOZU K (1989).
A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion.
J Clin Invest 84, 1440-1445.
- MORRISON S, UCHIDA N, WEISSMANN IL (1995).
The biology of hematopoietic stem cells.
Annu Rev Cell Dev Biol 11, 35-71.
- MOSER B, LOETSCHER P (2001).
Lymphocyte traffic control by chemokines.
Nat Immunol 2, 123-128.
- MOSER B, WOLF M, WALZ A, LOETSCHER P (2004).
Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control.
Trends Immunol 25, 75-84.
- MÜLLER A, HOMEY B, SOTO H, GE N, CATRON D, BUCHANAN ME, McCLANAHAN T, MURPHY E, YUAN W, WAGNER SN, BARRERA JL, MOHAR A, VERÁSTEGUI E, ZLOTNIK A (2001).
Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.
Nature 410, 50-56.
- MURDOCH C, FINN A (2000).
Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases.
Bood 95, 3032-3043.
- MURDOCH C, MONK PN, FINN A (1999a).
CXC chemokine receptor expression on human endothelial cells.
Cytokine 11, 704-712.
- MURDOCH C, MONK PN, FINN A (1999b).
Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells.
Immunology 98, 36-41.
- MURPHY PM (1996).
Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis.
Cytokine Growth Factor Rev 7, 47-64.
- MURPHY PM (2002).
International union of pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature.
Pharmacol Rev 54, 227-229.
- MURPHY PM, BAGGIOLINI M, CHARO IF, HÉBERT CA, HORUK R, MATSUSHIMA K, MILLER LH, OPPENHEIM JJ, POWER CA (2000).
International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors.
Pharmacol Rev 52, 145-176.

MURRAY CJL, LOPEZ AD (1997a).

Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study.

Lancet 349, 1498-1504.

MURRAY CJL, LOPEZ AD (1997b).

Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study.

Lancet 349, 1436-1442.

MURRY C, REINECKE H, PABON L (2006).

Regeneration gaps. Observations on stem cells and cardiac repair.

J Am Coll Cardiol 47, 1777-1785.

NAGASAWA T (2001).

Role of chemokine SDF-1/PBSF and its receptor CXCR4 in blood vessel development.

Ann N Y Acad Sci 947, 112-115.

NAGASAWA T, HIROTA S, TACHIBANA K, TAKAKURA N, NISHIKAWA S, KITAMURA Y, YOSHIDA N, KIKUTANI H, KISHIMOTO T (1996).

Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1.

Nature 382: 635-638.

NAGASAWA T, KIKUTANI H, KISHIMOTO T (1994).

Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor.

Proc Natl Acad Sci USA 91, 2305-2309.

NAGATA S, ISHIHARA T, ROBBERECHT P, LIBERT F, PARMENTIER M, CHRISTOPHE J, VASSART G (1992).

RDC1 may not be VIP receptor.

Trends Pharmacol Sci 13, 102-103.

NAYLER WG, ELZ JS (1986).

Reperfusion injury: laboratory artifact or clinical dilemma?

Circulation 74, 215-221.

NEWMAN PJ (2006).

New role for the GPVI/FcR γ chain complex.

Blood 107, 1248-1249.

NIBBS R, GRAHAM G, ROT A (2003).

Chemokines on the move: control by the chemokine "interceptors" Duffy blood group antigen and D6.

Semin Immunol 15, 287-294.

NUMAGUCHI Y, SONE T, OKUMURA K, ISHII M, MORITA Y, KUBOTA R, YOKOUCHI K, IMAI H, HARADA M, OSANAI H, KONDO T, MUROHARA T (2006).

The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction.

Circulation 114, 114-119.

- O'DONOVAN N, GALVIN M, MORGAN JG (1999).
Physical mapping of the CXC chemokine locus on human chromosome 4.
Cytogenet Cell Genet 84, 39-42.
- OBERLIN E, AMARA A, BACHELERIE F, BESSIA C, VIRELIZIER JL, ARENZANA-SEISDEDOS F, SCHWARTZ O, HEARD JM, CLARK-LEWIS I, LEGLER DF, LOETSCHER M, BAGGIOLINI M, MOSER B (1996).
The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1.
Nature 382, 833-835.
- OHAB JJ, FLEMING S, BLESCH A, CARMICHAEL ST (2006).
A neurovascular niche for neurogenesis after stroke.
J Neurosci 26, 13007-13016.
- ORIMO A, GUPTA PB, SGROI DC, ARENZANA-SEISDEDOS F, DELAUNAY T, NAEEM R, CAREY VJ, RICHARDSON AL, WEINBERG RA (2005).
Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion.
Cell 121, 335-348.
- PAPAYANNOPOULOU T (2000).
Mechanisms of stem-/progenitor-cell mobilization: the anti-VLA-4 paradigm.
Semin Hematol 37, 11-18.
- PAPAYANNOPOULOU T (2004).
Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization.
Blood 103, 1580-1585.
- PAPAYANNOPOULOU T, NAKAMOTO B (1993).
Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin.
Proc Natl Acad Sci USA 90, 9374-9378.
- PEICHEV M, NAIYER AJ, PEREIRA D, ZHU Z, LANE WJ, WILLIAMS M, OZ MC, HICKLIN DJ, WITTE L, MOORE MA, RAFII S (2000).
Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors.
Blood 95, 952-958.
- PELED A, GRABOVSKY V, HABLER L, SANDBANK J, ARENZANA-SEISDEDOS F, PETIT I, BEN-HUR H, LAPIDOT T, ALON R (1999).
The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34⁺ cells on vascular endothelium under shear flow.
J Clin Invest 104, 1199-1211.
- PELUS LM, FUKUDA S (2008).
Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft.
Leukemia 22, 466-473.

PERLIN JR, TALBOT WS (2007).

Signals on the move: Chemokine receptors and organogenesis in zebrafish.

Sci STKE 2007; *pe45*.

PETIT I, GOICHBURG P, SPIEGEL A, PELED A, BRODIE C, SEGER R, NAGLER A, ALON R, LAPIDOT T (2005).

Atypical PKC- ζ regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34⁺ progenitor cells.

J Clin Invest 115, 168-176.

PETIT I, JIN D, RAFII S (2007).

The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis.

Trends Immunol 28, 299-307.

PHILLIPS DR, CHARO IF, PARISE LV, FITZGERALD LA (1988).

The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa-complex.

Blood 71, 831-843.

PIERCE KL, PREMONT RT, LEFKOWITZ RJ (2002).

Seven-transmembrane receptors.

Nat Rev Mol Cell Biol 3, 639-650.

POHLENZ J., SANDERSLEBEN J. v. (1990).

Kreislaufstörungen: Störungen des Kreislaufs, Ischämie.

In: *Frei W.: Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. Aufl. 8, Parey Verlag, Berlin.*

PONOMARYOV T, PELED A, PETIT I, TAICHMAN RS, HABLER L, SANDBANK J, ARENZANA-SEISDEDOS F, MAGERUS A, CARUZ A, FUJII N, NAGLER A, LAHAV M, SZYPER-KRAVITZ M, ZIPORI D, LAPIDOT T (2000).

Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function.

J Clin Invest 106, 1331-1339.

PONOMARYOV T, PELED A, PETIT I, TAICHMAN RS, HABLER L, SANDBANK J, ARENZANA-SEISDEDOS F, MAGERUS A, CARUZ A, FUJII N, NAGLER A, LAHAV M, SZYPER-KRAVITZ M, ZIPORI D, LAPIDOT T (2000).

Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function.

J Clin Invest 106, 1331-1339.

PSCHYREMBEL W (2004).

In: *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*

Aufl. 260, Walter de Gruyter, Berlin, 887.

QUINONES MP, MARTINEZ HG, JIMENEZ F, ESTRADA CA, DUDLEY M, WILLMON O, KULKARNI H, REDDICK RL, FERNANDES G, KUZIEL WA, AHUJA SK, AHUJA SS (2007).

CC chemokine receptor 5 influences late-stage atherosclerosis.

Atherosclerosis 195, e92-e103.

RAFII S, LYDEN D (2003).

Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration.

Nat Med 9, 702-712.

RAGGO C, RUHL R, McALLISTER S, KOON H, DEZUBE BJ, FRÜH K, MOSES AV (2005).

Novel cellular genes essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.

Cancer Res 65, 5084-5095.

RAJAGOPAL S, KIM J, AHN S, CRAIG S, LAM CM, GERARD NP, GERARD C, LEFKOWITZ RJ (2010).

β -arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7.

Proc Natl Acad Sci USA 107, 628-632.

RAMOS CL, HUO Y, JUNG U, GHOSH S, MANKA DR, SAREMBOCK IJ, LEY K (1999).

Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E- deficient mice.

Circ Res 84, 1237-1244.

RANI MR, FOSTER GR, LEUNG S, LEAMAN D, STARK GR, RANSOHOFF RM (1996).

Characterization of beta-R1, a gene that is selectively induced by interferon beta (IFN-beta) compared with IFN-alpha.

J Biol Chem 271, 22878-22884.

RATAJCZAK MZ, MAJKA M, KUCIA M, DRUKALA J, PIETRZKOWSKI Z, PEIPER S, JANOWSKA-WIECZOREK A (2003).

Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles.

Stem Cells 21, 363-371.

RATAJCZAK MZ, RECA R, WYSOCZYNSKI M, YAN J, RATAJCZAK J (2006a).

Modulation of the SDF-1-CXCR4 axis by the third complement component (C3)-implications for trafficking of CXCR4⁺ stem cells.

Exp Hematol 34, 986-995.

RATAJCZAK MZ, ZUBA-SURMA E, KUCIA M, RECA R, WOJAKOWSKI W, RATAJCZAK J (2006b).

The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis.

Leukemia 20, 1915-1924.

REEVES JD, McKNIGHT A, POTEMPA S, SIMMONS G, GRAY PW, POWER CA, WELLS T, WEISS RA, TALBOT SJ (1997).

CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): use of the 7-transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3, and V28 for entry.

Virology 231, 130-134.

REIMER KA, JENNINGS RB (1992).

Myocardial ischemia, hypoxia and infarction.

In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE (editors). The heart and cardiovascular system. New York: Raven Press 1992, 1875-1973.

ROBIN AM, ZHANG ZG, WANG L, ZHANG RL, KATAKOWSKI M, ZHANG L, WANG Y, ZHANG C, CHOPP M (2006).

Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia.

J Cereb Blood Flow Metab 26, 125-134.

ROESSNER A (2004).

Grundlagen der Pathologie des Kreislaufs.

In: Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink HK: Allgemeine Pathologie. Aufl. 10, Urban & Fischer Verlag, München, 249-280.

ROESSNER A, KIRKPATRICK CJ, SCHNEIDER J (2001).

Gefäße.

In: Böcker W, Denk H, Heitz PU: Pathologie. Aufl. 2, Urban & Fischer Verlag, München 465-479.

ROSS R (1999).

Atherosclerosis is an inflammatory disease.

Am Heart J 138, 419-420.

RUBIN JB, KUNG AL, KLEIN RS, CHAN JA, SUN Y, SCHMIDT K, KIERAN MW, LUSTER AD, SEGAL RA (2003).

A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors.

Proc Natl Acad Sci USA 100, 13513-13518.

RUGGERI ZM (2002).

Platelets in atherothrombosis.

Nat Med 8, 1227-1234.

RUGGERI ZM (2003).

Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions.

J Thromb Haemost 1, 1335-1342.

SACHAIS BS, TURRENTINE T, DAWICKI McKENNA JM, RUX AH, RADER D, KOWALSKA MA (2007).

Elimination of platelet factor 4(PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE^{-/-} mice.

Thromb Haemost 98, 1108-1113.

SAEDERUP N, CHAN L, LIRA SA, CHARO IF (2008).

Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis.

Circulation 117, 1642-1648.

SALCEDO R, OPPENHEIM JJ (2003).

Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses.

Microcirculation 10, 359-370.

SALMAGGI A, MEDERNA E, CALATOZZOLO C, GAVIANI P, CANAZZA A, MILANESI I, SILVANI A, DiMECO F, CARBONE A, POLLO B (2009).

CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression in brain metastases.

Cancer Biol Ther 8, 1608-1614.

SÁNCHEZ-MADRID F, DEL POZO MA (1999).

Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions.

EMBO J 18, 501-511.

SANTOSO S, SACHS UJ, KROLL H, LINDER M, RUF A, PREISSNER KT, CHAVAKIS T (2002).

The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counter receptor for the leukocyte integrin Mac-1.

J Exp Med 196, 679-691.

SATTERTHWAITE AB, BURN TC, LE BEAU MM, TENEN DG (1992).

Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen.

Genomics 12, 788-794.

SAVAGE B, SALDIVAR E, RUGGERI ZM (1996).

Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor.

Cell 84, 289-297.

SCHÄCHINGER V, ERBS S, ELSASSER A, HABERBOSCH W, HAMBRECHT R, HOLSCHERMANN H, YU J, CORTI R, MATHEY DG, HAMM CW, SÜSELBECK T, WERNER N, HAASE J, NEUZNER J, GERMING A, MARK B, ASSMUS B, TONN T, DIMMELER S, ZEIHNER AM (2006).

Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of REPAIR-AMI trial.

Eur Heart J 27, 2775-2783

SCHÄFER A, SCHULZ C, EIGENTHALER M, FRACCAROLLO D, KOBASAR A, GAWAZ M, ERTL G, WALTER U, BAUERSACHS J (2004).

Novel role of the membrane-bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion.

Blood 103, 407-412.

SCHEURER B, ERNST M, DURRBAUM-LANDMANN I, FLEISCHER J, GRAGE-GRIEBENOW E, BRANDT E, FLAD HD, PETERSEN F (2000).

The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages.

Blood 95, 1158-1166.

SCHIER AF (2003).

Chemokine signaling: rules of attraction.

Curr Biol 13, R192-R194.

- SCHOBER A, KNARREN S, LIETZ M, LIN EA, WEBER C (2003).
Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice.
Circulation 108, 2491-2497.
- SCHOBER A, ZERNECKE A (2007).
Chemokines in vascular remodeling.
Thromb Haemost 97, 730-737.
- SCHÖMIG K, BUSCH G, STEPPICH B, SEPP D, KAUFMANN J, STEIN A, SCHÖMIG A, OTT I (2006).
Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction.
Eur Heart J 27, 1032-2007.
- SCHÖNEMEIER B, KOŁODZIEJ A, SCHULZ S, JACOBS S, HOELLT V, STUMM R (2008b).
Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain.
J Comp Neurol 510, 207-220.
- SCHÖNEMEIER B, SCHULZ S, HÖLLT V, STUMM R (2008a).
Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain.
J Neuroimmunol 198, 39-45.
- SCHRADER AJ, LECHNER O, TEMPLIN M, DITTMAR KE, MACHTENS S, MENGEL M, PROBST-KEPPER M, FRANZKE A, WOLLENSAK T, GATZLAFF P, ATZPODIEN J, BUER J, LAUBER J (2002).
CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer.
Br J Cancer 86, 1250-1256.
- SCHUMMER A, HABERMEHL K.-H. (1996).
Organe des Kreislaufs: Blutgefäße, Bau und Funktion.
In: Nickel R., Schummer A., Seiferle E.: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III, Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane. Aufl. 3, Parey Buchverlag, Berlin, 8-14.
- SCHUTYSER E, SU Y, YU Y, GOUWY M, ZAJA-MILATOVIC S, VAN DAMME J, RICHMOND A (2007).
Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells.
Eur Cytokine Netw 18, 59-70.
- SEIZER P, BORST O, LANGER HF, BÜLTMANN A, MÜNCH G, HEROUY Y, STELLOS K, KRÄMER B, BIGALKE B, BÜCHELE B, BACHEM MG, VESTWEBER D, SIMMET T, GAWAZ M, MAY AE (2009).
EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction.
Thromb Haemost 101, 682-706.

- SHAFRITZ DA, OERTEL M, MENTHENA A, NIERHOFF D, DABEVA MD (2006).
Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells.
Hepatology 43, 89-98.
- SHIMIZU N, SODA Y, KANBE K, LIU HY, MUKAI R, KITAMURA T, HOSHINO H (2000).
A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses.
J Virol 74, 619-626.
- SHIROZU M, NAKANO T, INAZAWA J, TASHIRO K, TADA H, SHINOHARA T, HONJO T (1995).
Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1(SDF-1) gene.
Genomics 28, 495-500.
- SIEGEL-AXEL D, LANGER H, LINDEMANN S, GAWAZ M (2006).
Role of platelets in atherosclerosis and inflammation.
Med Klin (Munich) 101, 467-475.
- SIERRO F, BIBEN C, MARTÍNEZ-MUÑOZ L, MELLADO M, RANSOHOFF RM, LI M, WOEHL B, LEUNG H, GROOM J, BATTEN M, HARVEY RP, MARTÍNEZ-A C, MACKAY CR, MACKAY F (2007).
Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7.
Proc Natl Acad Sci USA 104, 14759-14764.
- SIMMONS DL, SATTERTHWAITE AB, TENEN DG, SEED B (1992).
Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells.
J Immunol 148, 267-271.
- SIMMONS PJ, LEVESQUE J-P, ZANNETTINO AC (1997).
Adhesion molecules in haemopoiesis.
Baillière's Clin Haematol 10, 485-505.
- SIMON DI, CHEN Z, XU H, LI CQ, DONG J, McINTIRE LV, BALLANTYNE CM, ZHANG L, FURMAN MI, BERNDT MC, LÓPEZ JA (2000).
Platelet glycoprotein Ib α is a countereceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18).
J Exp Med 192, 183-204.
- SIXMA JJ, VAN ZANTEN GH, HUIZINGA EG, VAN DER PLAS RM, VERKLEY M, WU Y-P, GROS P, DE GROOT PG (1997).
Platelet adhesion to collagen: an update.
Thromb Haemost 78, 434-438.
- SMITH DF, GALKINA E, LEY K, HUO Y (2005).
GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 289, H1976-1984.

SREEDHARAN SP, ROBICHON A, PETERSON KE, GOETZL EJ (1991).
Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor.
Proc Natl Acad Sci USA 88, 4986-4990.

STEINHUBL SR, MOLITERNO DJ (2005).
The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis.
Am J Cardiovasc Drugs 5 (6), 399-408.

STELLOS K, BIGALKE B, LANGER H, GEISLER T, SCHAD A, KÖGEL A, PFAFF F, STAKOS D, SEIZER P, MÜLLER I, HTUN P, LINDEMANN S, GAWAZ M (2009).
Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34⁺ progenitor cells.
Eur Heart J 30(5), 584-593.

STELLOS K, BIGALKE B, STAKOS D, HENKELMANN N, GAWAZ M (2010b).
Platelet-bound P-selectin expression in patients with coronary artery disease: impact on clinical presentation and myocardial necrosis, and effect of diabetes mellitus and anti-platelet medication.
J Thromb Haemost 8(1), 205-207.

STELLOS K, LANGER H, DAUB K, SCHÖNBERGER T, GAUSS A, GEISLER T, BIGALKE B, MÜLLER I, SCHUMM M, SCHÄFER I, SEIZER P, KRÄMER BF, SIEGEL-AXEL D, MAY AE, LINDEMANN S, GAWAZ M (2008).
Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34⁺ cells to endothelial progenitor cells.
Circulation 117, 206-215.

STELLOS K, LANGER H, GNERLICH S, PANAGIOTA V, PAUL A, SCHÖNBERGER T, NINCI E, MENZEL D, MÜLLER I, BIGALKE B, GEISLER T, BÜLTMANN A, LINDEMANN S, GAWAZ M (2010a).
Junctional adhesion molecule A expressed on human CD34⁺ cells promotes adhesion on vascular wall and differentiation into endothelial progenitor cells.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 30, 1127-1136.

STRAUER BE (2001).
Akuter Myokardinfarkt.
Internist 42, 629-630.

STRAUER BE, BREHM M, ZEUS T, KÖSTERING M, HERNANDEZ A, SORG RV, KÖGLER G, WERNET P (2002).
Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans.
Circulation 106, 1913-1918.

STRIETER RM, POLVERINI PJ, KUNKEL SL, ARENBERG DA, BURDICK MD, KASPER J, DZUIBA J, DAMME JV, WALZ A, MARRIOTT D, CHAN SH, ROCZNIAK S, SHANAFELT AB (1995).
The functional role of the ERL motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis.
Biol Chem J 270, 27348-27357.

STUMM R, HÖLLT V (2007).

CXC chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain.

J Mol Endocrinol 38, 377-382.

STUMM RK, RUMMEL J, JUNKER V, CULMSEE C, PFEIFFER M, KRIEGLSTEIN J, HÖLLT V, SCHULZ S (2002).

A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia.

J Neurosci 22, 5865-5878.

SUGIYAMA T, OKUMA M, USHIKUBI F, SENSACKI S, KANAJI K, UCHINO H (1987).

A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia.

Blood 69, 1712-1720

SUMEN C, MEMPEL TR, MAZO IB, ANDRIAN UH v. (2004).

Intravital microscopy: visualizing immunity in context.

Immunity 3, 315-329.

TACHIBANA K, HIROTA S, IIZASA H, YOSHIDA H, KAWABATA K, KATAOKA Y, KITAMURA Y, MATSUSHIMA K, YOSHIDA N, NISHIKAWA S, KISHIMOTO T, NAGASAWA T (1998).

The chemokine receptors CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract.

Nature 393, 591-604.

TAKAHASHI T, KALKA C, MASUDA H, CHEN D, SILVER M, KEARNEY M, MAGNER M, ISNER JM, ASAHARA T (1999).

Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization.

Nat Med 5, 434-438.

TANAKA Y, ADAMS TH, SHAW S (1993).

Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes.

Immunol Today 14, 111.

TASHIRO K, TADA H, HEILKER R, SHIROZU M, NAKANO T, HONJO T (1993).

Signal sequence trap: A cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins.

Science 261, 600-603.

TEDDER TF, STEEBER DA, CHEN A, ENGEL P (1995).

The selectins: vascular adhesion molecules.

FASEB 9, 866-873.

TENSEN CP, FLIER J, VAN DER RAAIJ-HELMER EM, SAMPAT-SARDJOEPERSAD S, VAN DER SCHORS RC, LEURS R, SCHEPER RJ, BOORSMA DM, WILLEMZE R (1999).

Human IP-9: A keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3).

J Invest Dermatol 112, 716-722.

THAM TN, LAZARINI F, FRANCESCHINI IA, LACHAPELLE F, AMARA A, DUBOIS-DALCQ M (2001).

Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system.

Eur J Neurosci 13, 845-846.

THELEN M (2001).

Dancing to the tune of chemokines.

Nat Immunol 2, 129-134.

THELEN M, THELEN S (2008).

CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an essential trio?

J Neuroimmunol 198, 9-13.

THORED P, ARVIDSSON A, CACCI E, AHLENIUS H, KALLUR T, DARSALIA V, EKDAHL CT, KOKAIA Z, LINDVALL O (2006).

Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke.

Stem Cells 24, 739-747.

TISSIR F, WANG CE, GOFFINET AM (2004).

Expression of the chemokine receptor Cxcr4 mRNA during mouse brain development.

Brain Res Dev Brain Res 149, 63-71.

TONNESEN MG (1989)

Neutrophil endothelial cell interaction mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium

J Invest Dermatol, 53S-58S.

TRAN PB, BANISADR G, REN D, CHENN A, MILLER RJ (2007).

Chemokine receptor expression by neural progenitor cells in neurogenic regions of mouse brain.

J Comp Neurol 500, 1007-1033.

VAJKOCZY P, BLUM S, LAMPARTER M, MAILHAMMER R, ERBER R, ENGELHARDT B, VESTWEBER D, HATZOPOULOS AK (2003).

Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis.

J Exp Med 197, 1755-1765.

VALENTIN G, HAAS P, GILMOUR D (2007).

The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b.

Curr Biol 17, 1026-1031.

VANE JR, ÄNGGÅRD EE, BOTTING RM (1990).

Regulatory functions of the vascular endothelium.

N Engl J Med 323, 27-36.

- VASA M, FICHTLSCHERER S, AICHER A, ADLER K, URBICH C, MARTIN H, ZEIHNER AM, DIMMELER S (2001).
Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.
Circ Res 89, e1-e7.
- VILA-CORO AJ, RODRIGUEZ-FRADE JM, MARTIN DE ANA A, MORENO-ORTIZ MC, MARTINEZ AC, MELLADO M (1999).
The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway.
FASEB J 13, 1699-1710.
- VOLIN MV, JOSEPH L, SHOCKLEY MS, DAVIES PF (1998).
Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium.
Biochem Biophys Res Commun 242, 46-53.
- WAGNER DD, FRENETTE PS (2008).
The vessel wall and its interactions.
Blood 111, 5271-5281.
- WANG J, SHIOZAWA Y, WANG J, WANG Y, JUNG Y, PIANTA KJ, MEHRA R, LOBERG R, TAICHMAN RS (2008a).
The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer.
J Biol Chem 283, 4283-4294.
- WANG JF, LIU ZY, GROOPMAN JE (1998).
The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion.
Blood 72, 756-764.
- WANG Y, DENG Y, ZHOU GQ (2008b).
SDF-1 α /CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model.
Brain Res 1195, 104-112.
- WARD SG, BACON K, WESTWICK J (1989).
Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction.
Immunity 9, 1-11.
- WATT SM, FORDE SP (2008).
The central role of the chemokine receptor, CXCR4, in haematopoietic stem cell transplantation: will CXCR4 antagonists contribute to the treatment of blood disorders?
Vox Sanguis 94, 18-32.
- WEBER C (2005).
Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime.
Circ Res 96, 612-616.

WEBER C, SPRINGER TA (1997).

Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and stimulated by platelet-activating factor.

J Clin Invest 100, 2085-2093.

WEBER KS, HUNDELSHAUSEN P. v., CLARK-LEWIS I, WEBER PC, WEBER C (1999).

Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow.

Eur J Immunol 29, 700-712.

WEI YJ TANG Y, LI J, CUI CJ, ZHANG H, ZHANG XL, ZHANG H, HU SS (2007).

Cloning and expression pattern of dog SDF-1 and the implications of altered expression of SDF-1 in ischemic myocardium.

Cytokine 40, 52-59.

WEISSMAN IL (2000).

Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.

Cell 100, 157-168.

WEYRICH AS, McINTYRE TM, McEVER RP, PRESCOTT SM, ZIMMERMANN GA (1995).

Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor- α secretion. Signal integration and NF- κ B translocation.

J Clin Invest 95, 2297-2303.

WILLERSON JT, GOLINO P, EIDT J, CAMPBELL WB, BUJA M (1989).

Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions. Experimental evidence and potential clinical implications.

Circulation 80, 198-205.

WOJAKOWSKI W, TENDERA M, MICHALOWSKA A, MAJKA M, KUCIA M, MASLANKIEWICZ K, WYDERKA R, OCHALA A, RATJCZAK MZ (2004).

Mobilization of CD34^+ / CXCR4^+ , CD34^+ / CD117^+ , c-met^+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction.

Circulation 110, 3213-3220.

WOJAKOWSKI W, TENDERA M, ZEBZDA A, MICHALOWSKA A, MAJKA M, KUCIA M, MASLANKIEWICZ K, WYDERKA R, KRÓL M, OCHALA A, KOZAKIEWITCZ K, RATJCZAK MZ (2006).

Mobilization of CD34^+ , CD117^+ , CXCR4^+ , c-met^+ stem cells, and mononuclear cells is correlated with left ventricular ejection fraction and plasma NT-proBNP levels in patients with acute myocardial infarction.

Eur Heart J 27, 283-289.

WRIGHT DE, WAGERS AJ, GULATI AP, JOHNSON FL, WEISSMAN IL (2001).

Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells.

Science 294, 1933-1936.

WU D, LaROSA GJ, SIMON MI (1993).

G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8.

Science 261, 101-103.

WU X, LENSCH MW, WYLIE-SEARS J, DALEY GQ, BISCHOFF J (2007).

Hemogenic endothelial progenitor cells isolated from human umbilical cord blood.

Stem Cells 25, 2770-2776.

YANG XP, MATTAGAJASINGH S, SU S, CHEN G, CAI Z, FOX-TALBOT K, IRANI K, BECKER LC (2007).

Fractalkine upregulates intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells through CX3CR1 and the Jak Stat5 pathway.

Circ Res 101, 1001-1008.

YASUOKA H, KODAMA R, HIROKAWA M, TAKAMURA Y, MIYAUCHI A, SANKE T, NAKAMURA Y (2008).

CXCR4 expression in papillary thyroid carcinoma: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis.

BMC Cancer 8, 274

YEH ET, ZHANG S, WU HD, KÖRBLING M, WILLERSON JT, ESTROV Z (2003).

Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo.

Circulation 108, 2070-2073.

YIN AH, MIRAGLIA S, ZANJANI ED, ALMEIDA-PORADA G, OGAWA M, LEARY AG, OLWEUS J, KEARNEY J, BUCK DW (1997).

AC 133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.

Blood 90, 5002-5012.

YOSHIDA D, NOMURA R, TERAMOTO A (2009).

Signaling pathway mediated by CXCR7, an alternative chemokine receptor for stromal-cell derived factor-1alpha, in AtT20 mouse ACTH-secreting pituitary adenoma cells.

J Neuroendocrinol 21, 481-488.

YU L, CECIL J, PENG SB, SCHREMENTI J, KOVACEVIC S, PAUL D, SU EW, WANG J (2006).

Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1.

Gene 374, 174-179.

ZABEL BA, WANG Y, LEWÉN S, BERAHOVICH RD, PENFOLD ME, ZHANG P, POWERS J, SUMMERS BC, MIAO Z, ZHAO B, JALILI A, JANOWSKA-WIECZOREK A, JAEN JC, SCHALL TJ (2009).

Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands.

J Immunol 183, 3204-3211.

ZANNETTINO AC, BERNDT MC, BUTCHER C, BUTCHER EC, VADAS MA, SIMMONS PJ (1995).

Primitive human hematopoietic progenitors adhere to P-Selectin (CD62P).

Blood 85, 3466-3477.

ZERNECKE A, SCHOBER A, BOT I, VON HUNDELSHAUSEN P, LIEHN EA, MÖPPS B, MERICKSKAY M, GIERCHIK P, BIESSEN EA, WEBER C (2005).

SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells.

Circ Res 96, 784-791.

ZLOTNIK A, YOSHIE O (2000).

Chemokines: a new classification system and their role in immunity.

Immunity 2, 121-127.

ZOU YR, KOTTMANN AH, KORUDA M, TANIUCHI I, LITTMANN DR (1998).

Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development.

Nature 393, 595-599.

ZOU YR, KOTTMANN AH, KURODA M, TANIUCHI I, LITTMANN DR (1998).

Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development.

Nature 393, 595-599.

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1: Versuchsgruppen für das ligaturinduzierte Verletzungsmodell an der Arteria carotis communis.....51

Tab.2: Versuchsgruppen für das Ischämie-Reperfusionsmodell am Dünndarm.....51

Abb. 1:	Aufbau einer Gefäßwand.....	4
Abb. 2:	Bildung eines thrombotischen Gefäßverschlusses.....	9
Abb. 3:	Die Interaktion zwischen Monozyt und Endothel.....	11
Abb. 4:	Modell der Atherogenese.....	13
Abb. 5:	ruhende (links) und aktivierte (rechts) Thrombozyten.....	17
Abb. 6:	Interaktion zwischen Thrombozyten und dem Endothel	19
Abb. 7:	Thrombozytenadhäsion und -aggregation.....	21
Abb. 8:	Darstellung der Hämatopoese.....	24
Abb. 9:	Mobilisierung und Homing von Stammzellen	27
Abb. 10:	Aufbau von SDF-1/CXCL12	33
Abb. 11:	Struktur der Chemokinrezeptoren CXCR4 (links) und CXCR7 (rechts).....	38
Abb. 12:	Aufbau des Arbeitsplatzes.	57
Abb. 13:	Lage des Venenkatheters.	59
Abb. 14:	Vorbereitete Maus für die Aufnahmen an der A. carotis communis.	60
Abb. 15:	Vorbereitete Maus für die Aufnahmen am Dünndarm.	61
Abb. 16:	Freipräparierte Carotiden: (A) vor Ligatur, (B) Setzen der Ligatur, (C) nach Lösen der Ligatur.....	62
Abb. 17:	Freipräparierter Dünndarmabschnitt: (A) vor Ischämie, (B) Setzen der Ligaturen, (C) Ischämiephase, (D) Reperusionsphase.....	63
Abb. 18:	Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell.....	68
Abb. 19:	Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell.	68
Abb. 20.1:	Monozyten mit anti-CXCR4 vor Ligatur.....	69
Abb. 20.2:	Monozyten mit IgG _{2B} vor Ligatur.....	69
Abb. 20.3:	Monozyten mit anti-CXCR4 10 Minuten nach Ligatur.	70
Abb. 20.4:	Monozyten mit IgG _{2B} 10 min nach Ligatur.	70
Abb. 20.5:	Monozyten mit anti-CXCR4 30 Minuten nach Ligatur.	70
Abb. 20.6:	Monozyten mit IgG _{2B} 30 Minuten nach Ligatur.	70
Abb. 21:	Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell.....	71
Abb. 22:	Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell.	71
Abb. 23.1:	Monozyten mit anti-CXCR7 vor Ligatur.....	72
Abb. 23.2:	Monozyten mit IgG ₁ vor Ligatur.	72
Abb. 23.3:	Monozyten mit anti-CXCR7 10 Minuten nach Ligatur.	72
Abb. 23.4:	Monozyten mit IgG ₁ 10 Minuten nach Ligatur.....	72
Abb. 23.5:	Monozyten mit anti-CXCR7 30 Minuten nach Ligatur.	73
Abb. 23.6:	Monozyten mit IgG ₁ 30 Minuten nach Ligatur.....	73
Abb. 24:	Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	73

Abb. 25: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	74
Abb. 26: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	74
Abb. 27: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	76
Abb. 28: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	76
Abb. 29: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	76
Abb. 30.1: Monozyten mit anti-CXCR4 vor Ischämie.....	77
Abb. 30.2: Monozyten mit IgG _{2B} vor Ischämie.....	77
Abb. 30.3: Monozyten mit anti-CXCR4 30 Minuten nach Ischämie.....	78
Abb. 30.4: Monozyten mit IgG _{2B} 30 Minuten nach Ischämie.....	78
Abb. 30.5: Monozyten mit anti-CXCR4 60 Minuten nach Ischämie.....	78
Abb. 30.6: Monozyten mit IgG _{2B} 60 Minuten nach Ischämie.....	78
Abb. 31: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	79
Abb. 32: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	79
Abb. 33: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	79
Abb. 34: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	81
Abb. 35: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	81
Abb. 36: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Monozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	82
Abb. 37.1: Monozyten mit anti-CXCR7 vor Ischämie.....	83
Abb. 37.2: Monozyten mit IgG ₁ vor Ischämie.....	83
Abb. 37.3: Monozyten mit anti-CXCR7 30 Minuten nach Ischämie.....	83
Abb. 37.4: Monozyten mit IgG ₁ 30 Minuten nach Ischämie.....	83
Abb. 37.5: Monozyten mit anti-CXCR7 60 Minuten nach Ischämie.....	83
Abb. 37.6: Monozyten mit IgG ₁ 60 Minuten nach Ischämie.....	83
Abb. 38: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell.....	84
Abb. 39: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell.....	84
Abb. 40.1: Thrombozyten mit anti-CXCR4 vor Ligatur.....	85
Abb. 40.2: Thrombozyten mit IgG _{2B} vor Ligatur.....	85
Abb. 40.3: Thrombozyten mit anti-CXCR4 10 Minuten nach Ligatur.....	86
Abb. 40.4: Thrombozyten mit IgG _{2B} 10 Minuten nach Ligatur.....	86
Abb. 40.5: Thrombozyten mit anti-CXCR4 30 Minuten nach Ligatur.....	86
Abb. 40.6: Thrombozyten mit IgG _{2B} 30 Minuten nach Ligatur.....	86

Abb. 41: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell.....	87
Abb. 42: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell	87
Abb. 43.1: Thrombozyten mit anti-CXCR7 vor Ligatur.	88
Abb. 43.2: Thrombozyten mit IgG ₁ vor Ligatur.	88
Abb. 43.3: Thrombozyten mit anti-CXCR7 10 Minuten nach Ligatur.....	88
Abb. 43.4: Thrombozyten mit IgG ₁ 10 Minuten nach Ligatur.	88
Abb. 43.5: Thrombozyten mit anti-CXCR7 30 Minuten nach Ligatur.....	89
Abb. 43.6: Thrombozyten mit IgG ₁ 30 Minuten nach Ligatur.	89
Abb. 44: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	89
Abb. 45: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	90
Abb. 46: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	90
Abb. 47: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	91
Abb. 48: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	92
Abb. 49: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	92
Abb. 50.1: Thrombozyten mit anti-CXCR4 vor Ischämie.....	93
Abb. 50.2: Thrombozyten mit IgG _{2B} vor Ischämie.....	93
Abb. 50.3: Thrombozyten mit anti-CXCR4 30 Minuten nach Ischämie	93
Abb. 50.4: Thrombozyten mit IgG _{2B} 30 Minuten nach Ischämie.	93
Abb. 50.5: Thrombozyten mit anti-CXCR4 60 Minuten nach Ischämie.	94
Abb. 50.6: Thrombozyten mit IgG _{2B} 60 Minuten nach Ischämie.	94
Abb. 51: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	94
Abb. 52: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	95
Abb. 53: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	95
Abb. 54: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	96
Abb. 55: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	97
Abb. 56: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von Thrombozyten mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	97
Abb. 57.1: Thrombozyten mit anti-CXCR7 vor Ischämie.....	98
Abb. 57.2: Thrombozyten mit IgG ₁ vor Ischämie.	98
Abb. 57.3: Thrombozyten mit anti-CXCR7 30 Minuten nach Ischämie	98
Abb. 57.4: Thrombozyten mit IgG ₁ 30 Minuten nach Ischämie.....	98
Abb. 57.5: Thrombozyten mit anti-CXCR7 60 Minuten nach Ischämie.	99

Abb. 57.6: Thrombozyten mit IgG ₁ 60 Minuten nach Ischämie.....	99
Abb. 58: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell.....	99
Abb. 59: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell	100
Abb. 60.1: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 vor Ligatur.....	101
Abb. 60.2: CD34 ⁺ Zellen mit IgG _{2B} vor Ligatur.....	101
Abb. 60.3: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 10 Minuten nach Ligatur.	101
Abb. 60.4: CD34 ⁺ Zellen mit IgG _{2B} 10 Minuten nach Ligatur.	101
Abb. 60.5: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 30 Minuten nach Ligatur.	101
Abb. 60.6: CD34 ⁺ Zellen mit IgG _{2B} 30 Minuten nach Ligatur.	101
Abb. 61: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell.....	102
Abb. 62: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Carotismodell	102
Abb. 63.1: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 vor Ligatur.....	103
Abb. 63.2: CD34 ⁺ Zellen mit IgG ₁ vor Ligatur.	103
Abb. 63.3: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 10 Minuten nach Ligatur.	104
Abb. 63.4: CD34 ⁺ Zellen mit IgG ₁ 10 Minuten nach Ligatur.....	104
Abb. 63.5: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 30 Minuten nach Ligatur.	104
Abb. 63.6: CD34 ⁺ Zellen mit IgG ₁ 30 Minuten nach Ligatur.....	104
Abb. 64: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit der Kombination aus anti-CXCR4 und anti-CXCR7 beziehungsweise der Kombination aus den Isotypkontrollen im Carotismodell.....	105
Abb. 65: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit der Kombination aus anti-CXCR4 und anti-CXCR7 beziehungsweise der Kombination aus den Isotypkontrollen im Carotismodell.....	105
Abb. 66.1: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4+7 vor Ligatur.	106
Abb. 66.2: CD34 ⁺ Zellen mit IgG _{2B} +IgG ₁ vor Ligatur.....	106
Abb. 66.3: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4+7 10 Minuten nach Ligatur.....	106
Abb. 66.4: CD34 ⁺ Zellen mit IgG _{2B} +IgG ₁ 10 Minuten nach Ligatur.	106
Abb. 66.5: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4+7 30 Minuten nach Ligatur.....	107
Abb. 66.6: CD34 ⁺ Zellen mit IgG _{2B} +IgG ₁ 30 Minuten nach Ligatur.	107
Abb. 67: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	107
Abb. 68: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	108
Abb. 69: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	108
Abb. 70: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	109
Abb. 71: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	110
Abb. 72: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	110
Abb. 73.1: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 vor Ischämie.	111
Abb. 73.2: CD34 ⁺ Zellen mit IgG _{2B} vor Ischämie.....	111

Abb. 73.3: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 30 Minuten nach Ischämie.	111
Abb. 73.4: CD34 ⁺ Zellen mit IgG _{2B} 30 Minuten nach Ischämie.	111
Abb. 73.5: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR4 60 Minuten nach Ischämie.	112
Abb. 73.6: CD34 ⁺ Zellen mit IgG _{2B} 60 Minuten nach Ischämie.	112
Abb. 74: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	112
Abb. 75: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	113
Abb. 76: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Venolen).....	113
Abb. 77: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	114
Abb. 78: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	115
Abb. 79: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 beziehungsweise der Isotypkontrolle im Darmmodell (Arteriolen).....	115
Abb. 80.1: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 vor Ischämie.	116
Abb. 80.2: CD34 ⁺ Zellen mit IgG ₁ vor Ischämie.....	116
Abb. 80.3: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 30 Minuten nach Ischämie.	116
Abb. 80.4: CD34 ⁺ Zellen mit IgG ₁ 30 Minuten nach Ischämie.	116
Abb. 80.5: CD34 ⁺ Zellen mit anti-CXCR7 60 Minuten nach Ischämie.	116
Abb. 80.6: CD34 ⁺ Zellen mit IgG ₁ 60 Minuten nach Ischämie.	116

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.:	Arteria (lat.)
Abb.:	Abbildung
Abk.:	Abkürzung
ACD:	Acid-Citrate-Dextrose Puffer
ADP:	Adenosindiphosphat
AG:	Arbeitsgruppe; Arbeitsgemeinschaft
Ala:	Alanin
ApoE:	Apolipoprotein E
Arg:	Arginin
Asp:	Asparagin
ATP:	Adenosintriphosphat
BSA:	Bovines Serum Albumin
°C:	Grad Celsius
c:	Konzentration
Ca ²⁺ :	zweiwertiges Kalzium
Cat:	Katalog (catalog)
CD:	Differenzierungsmarker (Cluster of differentiation)
cGMP:	zyklisches Guanosinmonophosphat
CPDA:	Citrate Phosphate Dextrose Adenine
C-Terminus:	Carboxy-terminales Ende
DAG:	Diacyl-Glycerol
DCF:	5-(and-6-)-carboxyfluorescein diacetate
EPC:	Endotheliale Progenitorzellen (endothelial progenitor cells)
ERKs:	extracellular-signal-regulated kinases
Fa:	Firma
g:	relative Zentrifugalbeschleunigung
G-CSF:	granulocyte colony-stimulating factor
GDP:	Guanosindiphosphat
Glu:	Glutamin
GmbH:	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GP:	Glykoprotein
G-Protein:	Guaninnukleotidbindendes Protein

Gro:	growth-regulated protein
GTP:	Guanosintriphosphat
HIF-1 α :	hypoxia-inducible factor-1 α
HIV:	human immunodeficiency virus
i.v.:	intravenös
ICAM:	intercellular adhesion molecule
IFN:	Interferon
Ig:	Immunglobulin
IL:	Interleukin
Ile:	Isoleucin
IMD-Medium:	Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium
IP ₃ :	Phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphat
IP-9:	interferon-gamma-inducible protein 9
I-TAC:	interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
IVM:	Intravitalmikroskopie
JAK/STAT:	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
JAM:	junctional adhesion molecule
Kap.:	Kapitel
kDa:	Kilodalton
kg:	Kilogramm
KGW:	Körpergewicht
LDL:	low density lipoprotein
Ldlr:	low density lipoprotein receptor
Leu:	Leucin
LFA-1:	Lymphocyte function-associated antigen 1
MAB:	monoclonal antibody
Mac-1:	Macrophage-1 antigen
MACS:	magnetic affinity cell sorting
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MCP-1:	monocyte chemoattractant protein 1
mg:	Milligramm
min:	Minute
MIP:	Macrophage Inflammatory Protein
ml:	Milliliter

mm ² :	Quadratmillimeter
MMP:	Matrixmetalloproteinase
mRNA:	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleinacid)
MW:	Mittelwert
n:	Anzahl
NF-κB:	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nm:	Nanometer
NO:	Stickstoffmonoxid
N-Terminus:	Amino-terminales Ende
OP:	Operation
oxLDL:	oxidized low density lipoprotein
p:	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS:	phosphat buffered saline
PBSF:	pre-B cell growth-stimulating factor
PDGF:	platelet derived growth factor
PECAM:	platelet-endothelial cell adhesion molecule
PF4:	platelet factor 4
PGI ₂ :	Prostazyklin
pH:	pH-Wert (lat. pondus/potentia Hydrogenii)
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphat
PKC:	Proteinkinase C
PL:	Phospholipase
PMGCs:	primordial germ cells
PRP:	Plättchenreiches Plasma
PSGL-1:	P-selectin glycoprotein ligand-1
PTK:	Proteintyrosinkinase
RANTES:	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RDC1:	Receptor dog cDNA
RNA:	Ribonukleinsäure (ribonucleinacid)
RT:	Raumtemperatur
s:	Sekunde
SD:	Standardabweichung (standard deviation)
SDF-1:	stromal cell-derived factor 1
SEM:	Standardabweichung der Mittelwerte (standard error of the mean)

SIV:	simmian immundeficiency virus
Tyr:	Tyrosin
USA:	United States of America
V.:	Vena (lat.)
Val:	Valin
VCAM:	vascular cellular adhesion molecule
VEGF:	vascular endothelial growth factor
VIP:	Vasointestinales Peptid
VLA:	very late antigen
vWF:	von-Willebrand-Faktor
µg:	Mikrogramm
µl:	Mikroliter
µm:	Mikrometer

11 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. vet. A. Moritz der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Übernahme und Einreichung meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. A. May des Universitätsklinikums Tübingen für die externe Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. M. Gawaz danke ich für die Bewilligung des Projekts und die wissenschaftlichen Ratschläge in der wöchentlichen Laborbesprechung.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Frau Dr. med. vet. T. Schönberger für die geduldige und fachkundige Einarbeitung in die Methode der Intravitalmikroskopie sowie die bereitwillige Beantwortung aller Fragen. Durch ihr unermüdliches Engagement war sie mir stets eine große Hilfe bei der Umsetzung dieses Projekts.

Ich danke auch Herrn Dr. med. K. Stellos als Leiter dieses Projekts für die Vorgabe der Thematik, die Bereitstellung finanzieller Mittel und für seine wissenschaftliche Betreuung.

Von ganzem Herzen danke ich Frau J. Kwiatkowska und Frau L. Laptev für die Isolierung und Vorbereitung der humanen hämatopoetischen Stammzellen.

Frau K. Posavec danke ich vielmals für die Bereitstellung der humanen Monozyten und Thrombozyten.

Ich danke außerdem Frau Dr. rer. nat. A. Paul und Victoria Panagiota, die mir in literaturtechnischen Fragen stets eine wissenschaftlich kompetente Hilfe waren.

Einen ganz lieben Dank möchte ich all meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Gawaz aussprechen, die durch ihre kollegiale und hilfsbereite Art die ganzen Monate über für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten. An dieser Stelle danke ich allen Kollegen, die mir für die Tierversuche bereitwillig Blut spendeten.

Außerdem möchte ich allen Tierpflegern für die verantwortungsvolle Versorgung und Pflege der Mäuse danken.

Mit großem Respekt danke ich allen C57BL/6J Mäusen, deren Leben im Dienste der Wissenschaft geopfert werden mussten.

Ganz herzlich möchte ich außerdem meinen Freunden und ehemaligen Kommilitonen danken, die die letzten Jahre über immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ich danke meinem liebevollen Freund, der immer für mich da ist, wenn ich ihn brauche.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die das Studium über und während der Promotion immer an mich glaubte und mir bis heute durch ihre motivierenden und aufmunternden Worte stets eine große Stütze ist.

Erklärung nach § 10 Absatz 5 der Promotionsordnung:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Annegret Perk